

Aus dem Institut für Molekulare Zellbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften bzw. Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Untersuchungen zur Zellproliferation und fokalen Adhäsion
von Epithelzellen und Fibroblasten auf verschieden
strukturierten Titan- und Zirkoniumdioxidoberflächen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes 2012

vorgelegt von Dorothee Fontana
geboren am 05. Oktober 1985 in Bad Dürkheim

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	IX
Zusammenfassung.....	X
Abstract.....	XIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Geschichte der Implantate.....	1
1.2. Implantate in der Neuzeit.....	3
1.3. Titan.....	5
1.3.1. Biokompatibilität von Titan.....	5
1.4. Zirkoniumdioxid.....	6
1.4.1. Biokompatibilität von Zirkoniumdioxid.....	7
1.5. Der Implantat-Mukosa Kontakt.....	8
1.5.1. Das epitheliale Attachment.....	9
1.5.2. Das bindegewebige Attachment.....	10
1.5.3. Die Schutzfunktion des Implantat-Mukosa-Kontaktes.....	11
1.6. Fokale Adhäsionspunkte.....	11
1.6.1. Wichtige Bestandteile der fokalen Kontakte.....	12
1.6.1.1. Integrine.....	12
1.6.1.2. Zytoplasmatische Linkerproteine.....	13
1.6.2. Aufbau und Funktion der Fokalkontakte.....	13
1.7. Fragestellung.....	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1. Zellkulturreagenzien.....	15
2.2. Verwendete Chemikalien.....	16
2.3. Chemikalien für die Gele des Western Blots.....	16
2.4. Antikörper.....	17
2.5. Westernblot.....	17
2.6. Verwendete Geräte.....	18
2.7. Mikroskopie.....	18
2.8. Weitere Materialien.....	19
2.9. Computerprogramme.....	19

2.10.	Zellkultur	20
2.10.1.	Kultivierung.....	20
2.10.2.	Zellzählung zur Volumenbestimmung beim Aussäen der Proben	20
2.10.3.	Einfrieren der HNEpC-c	21
2.10.4.	Einfrieren der HGF1	21
2.11.	DAPI Färbung	21
2.12.	Werkstoffe und Oberflächen.....	22
2.12.1.	Versuchsaufbau.....	22
2.12.2.	Oberflächenrauigkeit	24
2.13.	Kontrollversuche	30
2.14.	Immunfluoreszenzmikroskopie	31
2.15.	Extraktion der Proteine.....	32
2.15.1.	Proteinkonzentration nach Bradford.....	32
2.16.	Western-Blot	33
2.16.1.	Proteintransfer nach Western-Blot.....	35
2.17.	Konfokale Mikroskopie	36
2.18.	Statistische Auswertung	38
2.19.	Zellproliferation	39
2.20.	Messung der Zellflächen und Ausläuferlängen der Zellen	39
3.	Ergebnisse.....	41
3.1.	Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford.....	41
3.2.	Analyse Western-Blot.....	41
3.2.1.	Nachweis von Vinculin	41
3.2.2.	Nachweis von Tubulin.....	43
3.3.	Generationszeiten	44
3.4.	Zellzahl.....	44
3.4.1.	Kontrollzylinder	45
3.4.1.1.	Kunststoff, Fibroblasten	45
3.4.1.2.	Kunststoff, Epithelzellen	45
3.4.2.	Fibroblasten	46
3.4.2.1.	ZrO ₂ , maschinert.....	46
3.4.2.2.	ZrO ₂ , gestrahlt	46
3.4.2.3.	ZrO ₂ , poliert	47
3.4.2.4.	ZrO ₂ , allgemein.....	47

3.4.2.5.	Titan, maschinert	48
3.4.2.6.	Titan, gestrahlt.....	49
3.4.2.7.	Titan, poliert.....	49
3.4.2.8.	Titan, allgemein	50
3.4.3.	Epithelzellen	51
3.4.3.1.	ZrO ₂ , maschinert.....	51
3.4.3.2.	ZrO ₂ , gestrahlt	51
3.4.3.3.	ZrO ₂ , poliert	52
3.4.3.4.	ZrO ₂ , allgemein.....	52
3.4.3.5.	Titan, maschinert	53
3.4.3.6.	Titan, gestrahlt.....	54
3.4.3.7.	Titan, poliert.....	54
3.4.3.8.	Titan, allgemein	55
3.5.	Anzahl primär nicht anwachsender Zellen	56
3.6.	Fläche und Ausläufer	57
3.6.1.	Fibroblasten	57
3.6.1.1.	ZrO ₂ , gestrahlt	57
3.6.1.2.	ZrO ₂ , maschinert.....	58
3.6.1.3.	ZrO ₂ , poliert	59
3.6.1.4.	ZrO ₂ , gesamt	61
3.6.1.5.	Titan, gestrahlt.....	63
3.6.1.6.	Titan, maschinert	64
3.6.1.7.	Titan, poliert.....	66
3.6.1.8.	Titan, gesamt.....	68
3.6.2.	Epithelzellen	70
3.6.2.1.	ZrO ₂ , gestrahlt	70
3.6.2.2.	ZrO ₂ , maschinert.....	71
3.6.2.3.	ZrO ₂ , poliert	72
3.6.2.4.	ZrO ₂ , gesamt	74
3.6.2.5.	Titan, gestrahlt.....	76
3.6.2.6.	Titan, maschinert	77
3.6.2.7.	Titan, poliert.....	78
3.6.2.8.	Titan, gesamt.....	79
3.7.	Direkter Vergleich zwischen Titan und ZrO ₂	81

3.7.1. Zellzahl	81
3.7.1.1. Fibroblasten.....	81
3.7.1.1.1. Polierte Oberfläche.....	81
3.7.1.1.2. Maschinierter Oberfläche.....	82
3.7.1.1.3. Gestrahlte Oberfläche	82
3.7.1.2. Epithelzellen	83
3.7.1.2.1. Polierte Oberfläche.....	83
3.7.1.2.2. Maschinierter Oberfläche.....	83
3.7.1.2.3. Gestrahlte Oberfläche	83
3.7.2. Fläche.....	84
3.7.2.1. Fibroblasten.....	84
3.7.2.1.1. Polierte Oberfläche.....	84
3.7.2.1.2. Maschinierter Oberfläche.....	84
3.7.2.1.3. Gestrahlte Oberfläche	85
3.7.2.2. Epithelzellen	85
3.7.2.2.1. Polierte Oberfläche.....	85
3.7.2.2.2. Gestrahlte Oberfläche	86
3.7.3. Länge der Zellausläufer	86
3.7.3.1. Fibroblasten.....	86
3.7.3.1.1. Polierte Oberfläche.....	86
3.7.3.1.2. Maschinierter Oberfläche.....	86
3.7.3.1.3. Gestrahlte Oberfläche	87
3.7.3.2. Epithelzellen	87
3.7.3.2.1. Polierte Oberfläche.....	87
3.7.3.2.2. Maschinierter Oberfläche.....	88
3.7.3.2.3. Gestrahlte Oberfläche	88
3.8. Vinculin	89
3.9. Korrelationstests	94
3.9.1. Fibroblasten.....	94
3.9.1.1. Fläche vs. Zellzahl (Titan).....	94
3.9.1.2. Fläche vs. Zellzahl (Zirkoniumdioxid).....	94
3.9.1.3. Fläche vs. Länge der Ausläufer (Titan)	95
3.9.1.4. Fläche vs. Länge der Ausläufer (Zirkoniumdioxid)	95
3.9.2. Epithelzellen	95

3.9.2.1.	Fläche vs. Zellzahl (Titan).....	95
3.9.2.2.	Fläche vs. Zellzahl (Zirkoniumdioxid).....	95
3.9.2.3.	Fläche vs. Länge der Ausläufer (Titan)	95
3.9.2.4.	Fläche vs. Länge der Ausläufer (Zirkoniumdioxid)	96
3.9.3.	Fibroblasten	96
3.9.3.1.	Fläche vs. Vinculin-Klasse (Titan).....	96
3.9.3.2.	Fläche vs. Vinculin-Klasse (Zirkoniumdioxid).....	96
3.9.4.	Epithelzellen	96
3.9.4.1.	Fläche vs. Vinculin-Klasse (Titan).....	96
3.9.4.2.	Fläche vs. Vinculin-Klasse (Zirkoniumdioxid).....	97
3.9.4.3.	Übersicht Korrelationstests	97
3.10.	Zusammenfassung der Ergebnisse	97
3.10.1.	Zellzahl	97
3.10.2.	Fläche/Ausläufer	98
3.10.3.	Direkter Vergleich der Oberflächen	100
3.10.4.	Vinculin	100
3.10.5.	Korrelationen	101
4.	Diskussion	103
	Literaturverzeichnis	XV
	Anhang.....	XXVI
	Danksagung/geplante Publikation	XXX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie der Hart- und Weichgewebe.	9
Abbildung 2: Silikonkissen mit Zirkoniumdioxid- und Titanlegierungszylinder verschiedener Oberflächen.	23
Abbildung 3: Abstandshalter.	24
Abbildung 4: Oberfläche poliertes Titan.	25
Abbildung 5: Oberfläche maschinierteres Titan.	26
Abbildung 6: Oberfläche gestrahltes Titan.	27
Abbildung 7: Oberfläche poliertes Zirkoniumdioxid.	28
Abbildung 8: Oberfläche maschinierteres Zirkoniumdioxid.	29
Abbildung 9: Oberfläche gestrahltes Zirkoniumdioxid.	30
Abbildung 10: Farbcodierung des Lookup Table.	38
Abbildung 11: Flächenmessung einer Zelle.	40
Abbildung 12: Längenmessung eines Ausläufers.	40
Abbildung 13: Western-Blot Vinculin.	42
Abbildung 14: Western-Blot Tubulin.	43
Abbildung 15: DAPI-Färbung.	45
Abbildung 16: Übersicht über die Fibroblastenanzahl auf den verschiedenen Zirkoniumdioxidoberflächen an allen Messtagen.	47
Abbildung 17: Übersicht über die Fibroblastenanzahl auf den verschiedenen Titanoberflächen an allen Messtagen.	50
Abbildung 18: Übersicht über die Epithelzellanzahl auf den verschiedenen Zirkoniumdioxidoberflächen an allen Messtagen.	52
Abbildung 19: Übersicht über die Epithelzellanzahl auf den verschiedenen Titanoberflächen an allen Messtagen.	55
Abbildung 20: Konfokale Fluoreszenzaufnahme eines Fibroblasten auf der gestrahlten Zirkoniumdioxidoberfläche.	58
Abbildung 21: Konfokale Fluoreszenzaufnahme eines Fibroblasten auf der maschinierteren Zirkoniumdioxidoberfläche.	59
Abbildung 22: Konfokale Fluoreszenzaufnahme eines Fibroblasten auf der polierten Zirkoniumdioxidoberfläche.	60
Abbildung 23: Übersicht über die Fläche der Fibroblasten auf den verschiedenen Zirkoniumdioxidoberflächen an allen Messtagen.	61

Abbildung 24: Übersicht über die Länge der Fibroblastenausläufer auf den verschiedenen Zirkoniumdioxidoberflächen an allen Messtagen.	62
Abbildung 25: Konfokale Fluoreszenzaufnahmen eines Fibroblasten auf der gestrahlten Titanoberfläche.	64
Abbildung 26: Konfokale Fluoreszenzaufnahme eines Fibroblasten auf der maschinierten Titanoberfläche.	66
Abbildung 27: Konfokale Fluoreszenzaufnahme eines Fibroblasten auf der polierten Titanoberfläche.	67
Abbildung 28: Übersicht über die Fläche der Fibroblasten auf den verschiedenen Titanoberflächen an allen Messtagen.	68
Abbildung 29: Übersicht über die Länge der Fibroblastenausläufer auf den verschiedenen Titanoberflächen an allen Messtagen.	69
Abbildung 30: Konfokale Fluoreszenzaufnahme einer Epithelzelle auf der gestrahlten Zirkoniumdioxidoberfläche.	71
Abbildung 31: Konfokale Fluoreszenzaufnahme einer Epithelzelle auf der maschinierten Zirkoniumdioxidoberfläche.	72
Abbildung 32: Konfokale Fluoreszenzaufnahme einer Epithelzelle auf der polierten Zirkoniumdioxidoberfläche.	73
Abbildung 33: Übersicht über die Fläche der Epithelzellen auf den verschiedenen Zirkoniumdioxidoberflächen an allen Messtagen.	74
Abbildung 34: Übersicht über die Länge der Epithelzellausläufer auf den verschiedenen Zirkoniumdioxidoberflächen an allen Messtagen.	75
Abbildung 35: Konfokale Fluoreszenzaufnahme einer Epithelzelle auf der gestrahlten Titanoberfläche.	77
Abbildung 36: Konfokale Fluoreszenzaufnahme einer Epithelzelle auf der maschinierten Titanoberfläche.	78
Abbildung 37: Konfokale Fluoreszenzaufnahme einer Epithelzelle auf der polierten Titanoberfläche.	79
Abbildung 38: Übersicht über die Fläche der Epithelzellen auf den verschiedenen Titanoberflächen an allen Messtagen.	79
Abbildung 39: Übersicht über die Länge der Epithelzellausläufer auf den verschiedenen Titanoberflächen an allen Messtagen.	80
Abbildung 40: Beispiel 1 für Vinculin-Score I.	89
Abbildung 41: Beispiel 2 für Vinculin-Score I.	89

Abbildung 42: Beispiel 1 für Vinculin-Score II.	90
Abbildung 43: Beispiel 2 für Vinculin-Score II.	91
Abbildung 44: Beispiel 1 für Vinculin-Score III.	92
Abbildung 45: Beispiel 2 für Vinculin-Score III.	92
Abbildung 46: Flächen- und Zellzahlkorrelation der Fibroblasten auf Titan.....	XXVI
Abbildung 47: Flächen- und Zellzahlkorrelation der Fibroblasten auf Zirkoniumdioxid	XXVI
Abbildung 48: Ausläuferlängen- und Flächenkorrelation der Fibroblasten auf Titan	XXVI
Abbildung 49: Ausläuferlängen- und Flächenkorrelation der Fibroblasten auf Zirkoniumdioxid	XXVII
Abbildung 50: Flächen- und Zellzahlkorrelation der Epithelzellen auf Titan	XXVII
Abbildung 51: Flächen- und Zellzahlkorrelation der Epithelzellen auf Zirkoniumdioxid	XXVII
Abbildung 52: Ausläuferlängen- und Flächenkorrelation der Epithelzellen auf Titan	XXVIII
Abbildung 53: Ausläuferlängen- und Flächenkorrelation der Epithelzellen auf Zirkoniumdioxid	XXVIII
Abbildung 54: Vinculin-Score- und Flächenkorrelation der Fibroblasten auf Titan	XXVIII
Abbildung 55: Vinculin-Score- und Flächenkorrelation der Fibroblasten auf Zirkoniumdioxid	XXIX
Abbildung 56: Vinculin-Score- und Flächenkorrelation der Epithelzellen auf Titan	XXIX
Abbildung 57: Vinculin-Score- und Flächenkorrelation der Epithelzellen auf Zirkoniumdioxid	XXIX

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Zellzahl der Fibroblasten auf Zirkoniumdioxid.	48
Tabelle 2: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Zellzahl der Fibroblasten auf Titan.	50
Tabelle 3: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Zellzahl der Epithelzellen auf Zirkoniumdioxid.....	53
Tabelle 4: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Zellzahl der Epithelzellen auf Titan.	55
Tabelle 5: Übersicht über die Anzahl angewachsener und nicht angewachsener Epithelzellen und Fibroblasten auf allen Werkstoffen und Oberflächen.	56
Tabelle 6: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Fläche der Fibroblasten auf Zirkoniumdioxid.	61
Tabelle 7: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Länge der Fibroblastenausläufer auf Zirkoniumdioxid.....	62
Tabelle 8: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Fläche der Fibroblasten auf Titan.	68
Tabelle 9: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Länge der Fibroblastenausläufer auf Titan.	69
Tabelle 10: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Fläche der Epithelzellen auf Zirkoniumdioxid.....	74
Tabelle 11: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Epithelzellausläufer auf Zirkoniumdioxid.	75
Tabelle 12: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Fläche der Epithelzellen auf Titan.	80
Tabelle 13: Übersicht über die Verteilung des Vinculins in den Fibroblasten und Epithelzellen auf allen Werkstoffen und Oberflächen.	93

Zusammenfassung

Bei Implantationen in der Mundhöhle zum Ersatz von fehlenden Zähnen wird das schützende Epithel durchbrochen. Um einen Langzeiterfolg eines Implantates zu gewährleisten, muss der Knochen und das umliegende Gewebe jedoch vor eindringenden Keimen geschützt werden. Deshalb ist ein schneller Heilungsvorgang im Bereich der Haut erforderlich. Zwei Gegebenheiten sind dabei von großer Bedeutung: der epitheliale sowie der bindegewebige Heilungsprozess. Es wird also nach einem Werkstoff mit entsprechender Oberfläche gesucht, der im Bereich der Epidermis die günstigsten Bedingungen für Epithelzellen und im Bereich der Dermis die günstigsten Bedingungen für Fibroblasten in Bezug auf Anhaftung und Proliferation am Implantat aufweist.

Ziel meiner Arbeit war es, das Proliferations- und Adhäsionsverhalten von Epithelzellen (HNEpC-c) und Fibroblasten (HGF1) auf den Oberflächen von Titan- und Zirkoniumdioxidzylindern zu untersuchen. Bei den verwendeten Oberflächen handelt es sich ausschließlich um die Deckflächen der Zylinder. Bei dem von mir verwendeten Titan handelt es sich um eine Titanlegierung (TiAl6V4). Dies gilt im Folgenden auch für die teilweise als Titan bezeichneten und von mir untersuchten Oberflächen. Die Zylinder unterschieden sich neben dem Werkstoff auch hinsichtlich ihrer Oberflächenstruktur. Die verwendeten Oberflächen waren entweder poliert, maschinert oder gestrahlt. Die Zylinder wurden jedoch nicht mit Beschichtungen versehen. Die Zellen wurden auf den Zylindern ausgesät und an den Tagen 1, 3 und 5 hinsichtlich ihrer Anzahl und der Ausbildung von fokalen Adhäsionspunkten untersucht. Die Ermittlung der Zellzahlen erfolgte mit Hilfe einer DAPI-Färbung und anschließender Auszählung unter dem Konfokalmikroskop. Dabei wurden nur die Zellen auf der Zylinderdeckfläche (Kreisfläche) berücksichtigt. Zur Untersuchung der fokalen Adhäsionskontakte benutzte ich eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Vinculin. Die Auswertung dieser Immunfluoreszenzfärbung erfolgte ebenfalls unter einem Konfokalmikroskop. Daneben untersuchte ich auch mikroskopisch die Größe der Zellen, die Anzahl ihrer Ausläufer sowie die Länge der einzelnen Ausläufer. Die Zellen wurden zu Beginn immer mit einer Ausgangskonzentration von 1×10^3 Zellen/Deckfläche ausgesät.

Bei meinen Untersuchungen ergaben sich folgende Ergebnisse:

Zellzahl:

Die Zellzahl der auf Titan ausgesäten Fibroblasten war auf der polierten Oberfläche stets am höchsten und auf der maschinieren stets am niedrigsten. Bei dem Werkstoff Zirkoniumdioxid fand sich auf der maschinieren Oberfläche stets die niedrigste Zellzahl. Auf beiden Werkstoffen kam es von Tag 3 auf Tag 5 zu einem Abfall der Zellzahl.

Die Zellzahl der auf Titan ausgesäten Epithelzellen war auf der gestrahlten Oberfläche stets am höchsten und auf der polierten stets am niedrigsten. Bei dem Werkstoff Zirkoniumdioxid fand sich dagegen auf der maschinieren Oberfläche stets die höchste Zellzahl. Auf beiden Werkstoffen befanden sich an Tag 5 keine Zellen mehr.

Fläche/Ausläufer:

Die Fläche der auf Titan ausgesäten Fibroblasten stieg auf allen Oberflächen von Tag 1 auf Tag 3 zunächst an und fiel zu Tag 5 hin wieder ab. Ebenso zeigte sich eine Abnahme der Länge der Ausläufer von Tag 1 zu Tag 3 und Tag 5 sowohl auf der gestrahlten, als auch auf maschinieren Oberfläche. Auf der polierten Oberfläche fand eine ständige Längenzunahme der Ausläufer statt. Auf dem Werkstoff Zirkoniumdioxid war die Zellfläche auf der polierten Oberfläche stets am größten. Jedoch befand sich auf allen Oberflächen an Tag 5 eine geringere Fläche als an Tag 1. Auf der maschinieren Oberfläche nahm die Länge der Ausläufer an jedem Messtag zu, auf der polierten Oberfläche dagegen an jedem Tag ab.

Die Fläche der auf Titan ausgesäten Epithelzellen nahm von Tag 1 auf Tag 3 auf allen Oberflächen zu. Auf der gestrahlten Oberfläche war die Fläche der Zellen stets am kleinsten. Auch die Länge der Ausläufer nahm auf allen Oberflächen von Tag 1 auf Tag 3 zu. Ebenso nahmen die Flächen der auf dem Werkstoff Zirkoniumdioxid ausgesäten Epithelzellen von Tag 1 auf Tag 3 hin zu. Auf der gestrahlten Oberfläche war sie stets am kleinsten, auf der maschinieren dagegen am größten. Die Ausläufer der Zellen waren auf der gestrahlten Oberfläche auch stets am längsten.

Direkter Vergleich der Oberflächen:

Die Anzahl der Zellen auf den verschiedenen Werkstoffen und Oberflächen unterschieden sich stets signifikant.

Vinculin:

Bei den auf Titan ausgesäten Fibroblasten befand sich das Vinculin entweder am Rand der Zellen oder in der ganzen Zelle verteilt. Bei dem Werkstoff Zirkoniumdioxid befand sich das Vinculin auf der maschinieren und polierten Oberfläche dagegen prozentual am meisten am Zellrand.

Bei den Epithelzellen war das Vinculin auf der gestrahlten Oberfläche des Titans und des Zirkoniumdioxids an beiden Tagen nicht eindeutig zu erkennen. Auf der maschinieren und polierten Zirkoniumdioxidoberfläche war es zum größten Teil ebenfalls nicht eindeutig zu erkennen. Nur bei der maschinieren und zum Teil bei der polierten Titanoberfläche war es deutlich am Zellrand sichtbar oder in der ganzen Zelle verteilt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es am günstigen wäre, die Oberflächen der Titan- und Zirkoniumdioxidabutments an die Dermis bzw. Epidermis individuell anzupassen. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse auch, dass sowohl die Epithelzellen als auch die Fibroblasten einen, *in vivo* stets vorkommenden, Biofilm benötigen, um dauerhaft die Implantatoberfläche besiedeln zu können. Zur Optimierung des bindegewebigen und epithelialen Integrationsprozess des Implantates in das umgebende Gewebe sind weitere *in vivo* Studien unabdingbar.

Abstract

Studies on cell adhesion and proliferation of epithelial cells and fibroblast on different titanium and zirconium dioxide surfaces

During dental implantations the protective epithelium gets injured. To be able to ensure long-term survival of an implant the bone and surrounding tissue must be protected against invading germs. Therefore, a fast healing process in the mucosa is required. During this process you have to differentiate between two separate healing processes: the epithelial and the connective tissue healing process. To optimize this process you need a material with a surface with different relevant characteristics in the area of the epidermis adjusted to epithelial cells and in the area of the dermis adjusted to fibroblasts in order to improve the adhesion and proliferation of the cells at the implant.

The aim of my work was to investigate the proliferation and adhesion of epithelial (HNEpC-c) and fibroblast cell lines (HGF1) on titanium and zirconia dioxide cylinders. The titanium used is a titanium alloy (TiAl6V4). This refers to the hereinafter mentioned titan used for my studies. The cylinders differed in addition to the material aspects in terms of their surface structure. The surfaces used were either polished, machined or sandblasted. The cylinders were not provided with coatings. The cells were seeded on the cylinders and examined on days 1, 3 and 5 in terms of number and formation of focal adhesion points. The determination of cell counts was performed using a Dapi-staining and subsequent counting under the confocal microscope. To investigate the focal adhesion contacts I used immunofluorescence staining for vinculin. The analysis of this immunofluorescence staining was also done under a confocal microscope. In addition, I also examined microscopically the cell size, the number of its offshoots, as well as the length of the cell processes. The seeded cells always had an initial concentration of 1×10^3 cells/surface.

My research showed the following results:

Cellcount:

The cell numbers of fibroblasts seeded on titanium was always the highest on polished surfaces and on the machined surfaces always the lowest. On the zirconia material the machined surfaces always showed the lowest number of cells. On both materials occurred from day 3 to day 5 a decrease in cell number. The cell number of epithelial cells seeded on titanium was on the blasted surfaces

always the highest, and on the polished surfaces always the lowest. On the zirconia material on the other hand, the machined surfaces showed always the highest cell numbers. On both materials no cells were found at day 5.

Area/extensions:

The area of epithelial cells seeded on titanium increased on all surfaces from day 1 till day 3 and decreased again on day 5. Furthermore there was a decrease in the length of the cell processes from day 1 to day 3 and day 5, both on the blasted as well as the machined surfaces. On the polished surface on the other hand was a continuous increase in length of the cell processes. On the zirconia material the cell area was always the largest on polished surfaces. But there was always a smaller cell area found on all surfaces at day 5 than on day 1. On the machined surface the length of the cell processes increased continuously in contrast to the polished surfaces where they showed a continuous decrease from day 1 on. The area of epithelial cells seeded on titanium increased from day 1 to day 3 on all surfaces. On the sandblasted surfaces the cell areas was always the smallest. The length of the cell processes increased also on all surfaces from day 1 to day 3. Furthermore there was an increase of epithelial cell-areas on the zirconia surfaces from day 1 to day 3, to. The cell areas were on blasted surfaces always the smallest, and on the machined surfaces the greatest. The cell processes on the blasted surfaces always the longest.

Direct comparison of the surfaces:

The number of cells on different materials and surfaces always differed significantly.

Vinculin:

In the epithelial cells on the blasted surface of the titanium and zirconium dioxide the vinculin was on both days not clearly detectable. On the machined and polished zirconium dioxide surfaces the vinculin was not clearly detectable in most cases either. Only on the machined and partly on the polished titan surfaces vinculin was clearly visible at the cell boundary or distributed throughout the cell. These results show that it would be advantageous if the surface structure of titanium and zirconium dioxid abutments would be adjusted individually to the dermis and epidermis. Furthermore these results also indicate that the epithelial cells as well as fibroblasts need a, in vivo always available, biofilm in order to permanently colonize

the implant surface. In order to optimize the connective tissue and epithelial integration of the implant into the surrounding tissue further in vivo studies are indispensable.

1. Einleitung

1.1. Geschichte der Implantate

Bereits im 6. bis 5. Jahrtausend v. Chr. finden sich Ansätze der Implantologie. Die Urbevölkerung Mittelamerikas soll bereits implantologische Techniken entwickelt haben. Jedoch gleichen diesen Techniken eher einer (Re-) Transplantation von heterologen, homologen oder autologen Zähnen. Die, nach unserer Sicht, ersten ernsthaften Implantationen der Neuzeit waren Sofortimplantate. Bei diesen wurde sofort nach der Extraktion des Zahnes die Extraktionswunde mit alloplastischem Material gefüllt. 1807 publizierten Jourdan und Magiolo ihr Buch „Manual d’art dentaire“. In diesem beschrieben sie das Vorgehen beim Setzen eines Implantates. Der Stiftzahn wurde auf ein zuvor in der leeren Alveole versenktes Goldrohr aufgesetzt. Das konisch geformte Goldrohr wurde vorher über eine vierarmige Krallen fixiert. Über 100 Jahre später, 1913, wurde von Greensfeld ein aus einer Platin-Iridium-Legierung hergestelltes enossales wurzel- bzw. korbförmiges Hohlimplantat gesetzt (Schwenzer 2000). An der Harvard University wurde dazu von Strock (Strock 1939) eine Schraube aus Vitallium, einem rostfreien Stahl, benutzt. Er änderte die Form der Implantate so, dass diese nicht mehr einer Zahnwurzel, sondern einer Schraube ähnelten. Bereits damals beschrieb er, als einer der Ersten überhaupt, dass der Langzeiterfolg eines Implantates auch von einer korrekten Okklusion abhängt. Da Ende der 30er-Jahre in anderen medizinischen Bereichen, wie z. B. in der orthopädischen Chirurgie und Unfallchirurgie neue Werkstoffe eingeführt wurden (nicht-oxidierende Metalle wie Chrom, Cobalt und Molybdän), dauerte es auch nicht lange bis diese Metalle Einzug in die dentale Medizin erhielten. Formigini (Formigini 1947) benutzte eine Helikoloidalschraube aus Tantal. Es folgten einige Abwandlungen dieser Schraube. Unter anderem die Cherchève-Schraube und die Tantalnadel nach Scialom (Schwenzer 2000).

1937 wurde von Müller (Müller 1937) eine weitere Implantationstechnik beschrieben. Die subperiostale Implantationstechnik. Dabei soll das Implantat zwischen Knochen und Periost zu liegen kommen und den Knochen nicht penetrieren. Anfänglich schien diese Methode den physiologischen Verhältnissen mehr als bei einem enossalem Implantat zu entsprechen. In den 50er- und 60er-Jahren wurde diese aufwändige Technik oft angewendet. Doch dann gab es Studien, wie die von Reichenbach und

Naucke (Reichenbach und Naucke 1955). Sie ließen ein subperiostal implantiertes Metallgerüst aus Wisil zwei Monate lang unbelastet in den Oberkieferknochen von Hunden einheilen. Wisil ist eine vittaliumähnliche Legierung. Danach erfolgten histologische Untersuchungen, die zeigten, dass das Implantat durch eine fibröse Grenzschicht vom Knochen getrennt war. Es lag also keine direkte Verbindung zwischen Knochen und Implantat vor. 1957 publizierte Purin (Purin 1957) seine Studie, die besagte, dass sich die Knochenverhältnisse nach der Gerüstentfernung stark verschlechterten. Solche Studienergebnisse sorgten dafür, dass diese aufwändige Implantationstechnik wieder verworfen wurde. Also kam man in den 70er Jahren immer mehr hin zu den enossalen Implantaten. Die Entwicklung enossaler Implantate wurde stark geprägt und voran getrieben von Leonhart Linkow und Per-Ingvar Brånemark. Linkow (Linkow 1966) war überzeugt von Blattimplantaten. Das besondere dieser Implantate ist, dass sie in ihrer Gestaltung keiner Zahnwurzel ähneln. Ihr Prinzip besteht darin, dass sie eine größtmögliche Kontaktfläche zum Knochen haben sollen. Ein Nachteil dieser Blattimplantate ist, dass sich im Falle einer Entzündung diese am Implantat entlang ausbreitet. Daher setzt man heute vermehrt auf Implantate mit einem wurzelartigen Aussehen.

Brånemark (Brånemark et al. 1969) entdeckte durch seine Studien, dass der Werkstoff Titan sehr gut in den Knochen einheilt und vom Organismus akzeptiert wird.

Obwohl sich Brånemark und Schulte einig darüber waren, dass eine funktionslose Einheilung sehr wichtig ist, unterschieden sich ihre Meinungen bezüglich der Art der Einheilung. Brånemark stand für die subgingivale, Schulte für eine transgingivale Einheilphase. Bis heute wurden die von Brånemark entwickelten Implantate nur wenig verändert. Die Schraube besteht aus Reintitan. Zu Beginn wurden diese Implantate hauptsächlich zur Unterkieferversorgung genutzt. Im Gegensatz dazu bestand das Implantat von Schulte in erster Linie aus einer Aluminiumoxidkeramik. Genutzt wurde dieses sogenannte Tübinger Sofort-Implantat im Frontzahnbereich zur Versorgung von Einzelzahnücken. Das Implantat hat ein zahnwurzelförmiges Aussehen und ist stufenartig geformt (Schulte & Heimke 1976, Schulte et al. 1980, Watzek et al. 2000). Heute wird dieses Implantat unter dem Namen Frialit 2 vermarktet und besteht nicht mehr aus Keramik, sondern aus dem Werkstoff Titan und ist zudem in verschiedenen Formen erhältlich. Beim Frialit 2-Implantat stehen, im Gegensatz zu seinem Vorgängermodell, verschieden konfektionierte Aufbauteile zur

Verfügung. Die Suprakonstruktionen des Vorgängermodells waren durch individuell angefertigte Aufbauten (Tetsch 1991, Schulte et al. 1992, Watek et al. 2000, Wagner & Nawas 2004) gekennzeichnet.

Bis zu diesem Zeitpunkt bestanden also alle Implantate aus einer starren Verbindung, die den endossalen mit dem extraossärem Anteil verbanden. Es fehlte folglich jede parodontale Beweglichkeit wie sie der natürliche und gesunde Zahn aufweist. Um diese Steifheit des Implantates zu umgehen wurde versucht, durch das Einbringen eines Kunststoffteils, diese Beweglichkeit zu imitieren. Dazu wurde das Zylinderimplantat (IMZ) noch mit einer Titanplasmaspritzbeschichtung versehen, um eine Oberflächenvergrößerung zu erreichen (Schwenzer 2000).

Als nächstes kamen die ITI-Implantate der Firma Straumann auf den Markt, bei welchen es ebenfalls zu einer transgingivalen Einheilung kommt. 1979 wurden sie als Hohlzylinder- und Hohlschraubenimplantat genauso wie das Zylinderimplantat mit einer Titanplasmaspritzbeschichtung bearbeitet (Schwenzer 2000).

Inzwischen gibt es viele sehr verschiedene Systeme, die sich in ihrer Form (zylindrisch-schraubenförmig, zylindrisch und wurzelförmig), ihrer Beschichtung (beschichtet oder unbeschichtet), dem Einheilungsvorgang (trans- oder subgingival) sowie der Art bzw. der Anzahl an prothetischen Hilfteilen unterscheiden (Schwenzer 2000).

1.2. Implantate in der Neuzeit

Zum jetzigen Zeitpunkt sind Implantate, so wie man sie seit ungefähr 40 Jahren kennt, ein wichtiger Bestandteil der Zahnmedizin (Schlegel et al. 2002). Sie dienen dazu, den zahnlosen bzw. teilbezahnten Kiefer zu versorgen. Ein großer Vorteil der dentalen Implantate besteht darin, dass durch sie Einzelzahnücken ohne Beschleifen der Nachbarzähne geschlossen werden können (Buser et al. 1997; Henry et al. 1996; Jemt 1994; van Steenberghe 1989).

Aufgrund seiner hohen Erfolgsrate in der Implantologie dient Titan als Implantatwerkstoff (Adell et al. 1990; Henry et al. 1996).

Brånemark entdeckte bei seinen Studien, dass eingebrachtes Titan in den Knochen einwächst und in diesem auch gut verankert ist. Er stellte weiterhin fest, dass es nach einiger Zeit im Knochen auch nur noch schwer zu entfernen war (Brånemark und Breine 1964; Brånemark et al. 1969). Brånemark beschrieb dies 1985 mit dem Begriff der Osseointegration. Dies meint einen „direkten strukturellen und

funktionellen Kontakt zwischen Knochen und Implantatoberfläche“. Durch das Einbringen des Implantates kommt es zwar zu einer (wie weiter unten auch beschrieben) biologischen Reaktion, jedoch gleicht diese keiner Abstoßungsreaktion, sondern eher einer Integration des Implantats in den Knochen (Brånemark 1983). Kurz darauf zeigte sich jedoch, dass man dieses Phänomen nicht nur zwischen Titan und Knochen beobachtet (Albrektsson et al. 1988), sondern dass es sich dabei um eine Reaktion handelt, auf die Biomaterialien im Generellen Einfluss nehmen. Dieser Einfluss kann sich positiv oder negativ auswirken (Davies 1998, 2003).

Für Titan als Implantatwerkstoff sprechen vor allem dessen Korrosionsverhalten und seine hohe Stabilität (Kasemo und Lausmaa 1993). Zudem ist Titan ein bioinertes Material (Albrektsson et al. 1988; Kasemo und Lausmaa 1988). Trotzdem gibt es Studien, die besagen, dass Titan verschiedene zelluläre Stoffwechselvorgänge negativ beeinflusst (Bianco et al. 1996; Evans 1994; Lalor et al. 1991; Weingart et al. 1994). „Inwieweit diese Literaturhinweise klinische Relevanz zeigen, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beurteilt werden“ (Volz 2003).

Der Aspekt der Ästhetik gewinnt zurzeit jedoch immer mehr an Bedeutung, weshalb man gerade im Frontzahnbereich versucht Alternativen zu Titan zu etablieren. Bei einer dünnen periimplantären Mukosa kommt es nämlich zum Durchschimmern des gräulichen Titans (Heydecke et al. 1999; Wohlwend et al. 1996).

Man ist daher auf der Suche nach einem Werkstoff, der die Stabilität und Biokompatibilität des Titans hat, jedoch bessere ästhetische Eigenschaften aufweist. Als nichtmetallisches Material kam nun das zahnfarbene Zirkoniumdioxid zum Einsatz (Prestipino und Ingber 1996). Zirkoniumdioxid bietet zudem für vollkeramische Kronen eine optimale Grundlage (Moberg et al. 1999). Heute wird Zirkoniumdioxid bereits für Wurzelstifte, Brücken- und Kronenmaterial sowie Implantataufbauten benutzt (Burke et al. 2006; Canullo 2007; Mainjot et al. 2006; Meyenberg et al. 1995). Durch seine Härte und seine hohe Festigkeit (Christel et al. 1989; Ichikawa et al. 1992) hat sich Zirkoniumdioxid in den eben genannten zahnmedizinischen Bereichen bereits ausgezeichnet. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei Implantaten mit vollkeramischen Abutments aus Zirkoniumdioxid im Prämolaren- und Molarenbereich nach einer Einheilzeit von 6 Monaten und unter voller Belastung kein mechanisches Versagen der Abutments oder Entzündungen des periimplantären Weichgewebes festgestellt werden konnten (Nothdurft et al. 2009). Nothdurft (Nothdurft et al. 2011) untersuchte in einer weiteren Studie das

Bruchverhalten von geraden und abgewinkelten Abutments aus Zirkoniumdioxid unter dem Einfluss einer künstlichen Alterung. Dabei wurden vier verschiedene Gruppen untersucht. Gruppe 1 und Gruppe 2 stellten eine klinische Situation mit einer, aus prothetischer Sicht, idealen Implantatsituation dar. Dies ermöglichte die Verwendung eines geraden vorgefertigten Abutments. Die Abutments bei Gruppe 3 und Gruppe 4 waren dagegen abgewinkelt und es wurde thermomechanisch und bis zum statischen Versagen belastet. Es konnte gezeigt werden, dass die künstlich herbeigeführte Alterung in keiner der Gruppen zu einem signifikanten Abfall der Belastbarkeit führte. Die abgewinkelten Abutments zeigten zudem eine höhere Bruchfestigkeit als die geraden. Wurde keine künstliche Alterung eingesetzt, so war dieser Unterschied im Bruchverhalten als signifikant zu bezeichnen. Diese Studie zeigt, dass es bei Zirkoniumdioxid auch nach einem gewissen Alterungsprozess nicht zu einem Nachlassen der Belastbarkeit kommt.

1.3. Titan

Titan zählt zu der Gruppe der Leichtmetalle und zeichnet sich hauptsächlich durch die folgenden 3 Eigenschaften aus: die geringe thermische Ausdehnung, die hohe Bruchfestigkeit von 1000 - 1200 MPa und die Korrosionsfestigkeit (Abke 2003; Schmidt 1992; Steinemann 1988; Wagner und Al-Nawas 2004). Sobald Titan mit Sauerstoff in Kontakt kommt, wird an der Oberfläche eine inerte Oxidschicht ausgebildet (Zwicker 1959). Diese verleiht dem Titan sein gutes Gesamtkorrosionsverhalten sowie seine Biokompatibilität (Steinemann 1988).

1.3.1. Biokompatibilität von Titan

Zunächst ging man irrtümlicherweise davon aus, dass Titan ein bioinertes Metall sei, welches im umliegenden Gewebe zu keinen Reaktionen und zu keinen Wechselwirkungen mit irgendwelchen Stoffwechselvorgängen führe (Schmidt 1992). Dies leitete Schmidt von drei Thesen ab:

1. Die Hydroxide des Titans sowie das Titan selbst besitzen eine geringe Löslichkeit.
2. Titan bildet, wenn überhaupt, stabile Komplexe, jedoch bildet es kaum Chelate.

3. Es werden stabile Komplexe gebildet, die im Körper jedoch nicht transportiert werden können.

Inzwischen hat man allerdings gefunden, dass es auch bei Titan z. B. bei einem zu niedrigem pH-Wert oder einer Änderung der mechanischen Belastung zur Korrosion kommt (Tschernitschek et al. 2005). Auch der Kontakt mit Legierungen, wie sie in der Medizin verwendet werden, kann zur Korrosion führen und zwischen Titan und anderen in der Zahnmedizin verwendeten Metallen kann es zur Entstehung eines galvanischen Elements kommen (Reclaru und Meyer 1994). Ebenso steigert der Kontakt mit Fluoriden bei Titan das Korrosionsverhalten. So kann das Fluoridgel, welches zur Kariesprophylaxe genutzt wird wegen seines niedrigen pH-Wertes zur Korrosion des Titans führen (Toumelin-Chemla et al. 1996).

Inzwischen hat man herausgefunden, dass Titan auch eine allergische Reaktion hervorrufen kann. Bei dieser Abwehrreaktion des Körpers vom Antikörper-unabhängigen Typ IV kommt es zu einer Überempfindlichkeitsreaktion aktivierter Allergen-spezifischer T-Zellen. Sicilia et al. (2008) untersuchte in seiner Studie 1500 Patienten, die zuvor mit Titanimplantaten versorgt wurden auf eine allergische Reaktion gegenüber des Titans. Von den insgesamt 1500 Probanden reagierten 9 positiv auf den Allergietest. Die Titanallergieprävalenz bei Patienten, mit einem Titanimplantat liegt so bei 0,6% und ist somit sehr niedrig.

Klinische Studien zeigen zwar, dass Titan biologische Prozesse negativ beeinflussen kann, allerdings ist noch nicht geklärt, welche klinische Relevanz dies hat (Bianco et al. 1996; Sakai et al. 1994; Stejskal et al. 1999). Es zeigt allerdings auch, dass die Forderung nach metallfreien dentalen Implantaten zunehmen könnte.

1.4. Zirkoniumdioxid

In letzter Zeit rücken Zirkoniumdioxidkeramiken immer mehr in den Vordergrund, da sie durch den Zusatz von Yttriumoxid erstmals Materialeigenschaften aufweisen, welche an die der Metalle heranreichen. Diese Keramiken besitzen neben einer hohen Risszähigkeit und Härte auch eine hohe Biegefestigkeit (Covacci et al. 1999).

In einer Studie untersuchten Kohal et al. (2003) im Tierexperiment in wie weit Zirkoniumdioxidimplantate unter Belastung osseointegriert werden können und kamen zu dem histologischen Ergebnis, dass es keine Unterschiede zu den Kontrollimplantaten aus Titan gab.

Depprich et al. (2008) implantierten im Tierexperiment bei 12 Meerschweinchen insgesamt 48 Zirkoniumdioxid- und Titanimplantate in deren Schienbeine. In regelmäßigen Abständen (1, 4 und 12 Wochen) wurden Proben genommen und diese histologisch untersucht. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass bei Zirkoniumdioxid eine genauso gute Knochenanlagerung wie bei Titan erreicht werden kann.

Blaschke und Volz (2006) veröffentlichten das Ergebnis einer Studie bei der 66 Implantate aus Keramik bei 34 Patienten eingesetzt wurden. Der enossale Teil des Implantats wurde vor der Insertion sandgestrahlt, der transmuköse Teil poliert. Im Unterkiefer wurden die Implantate nach 4, im Oberkiefer nach 6 Monaten mit einer Krone aus Keramik versorgt. Ein bzw. zwei Jahre später wurde der Knocheneinbau mit Hilfe von Röntgenaufnahmen bewertet und das Weichgewebe klinisch untersucht. Eine „gute Osseointegration“ sowie Weichgewebsparameter, wie man sie auch bei einem natürlichen und gesunden Zahn vorfindet, fand man bei 98% der Implantate.

Im selben Jahr untersuchte Mellinghoff (2006) 71 Patienten, bei denen 189 Zirkoniumdioxidimplantate eingesetzt wurden. 8,2 Monate betrug die mittlere Liegezeit der Implantate und nach einem Jahr lag die Überlebenswahrscheinlichkeit der implantierten Implantate bei 93% nach Kaplan-Meier (1958). Nach einem Jahr wurde der Erfolg von 44 Implantaten röntgenologisch und klinisch, nach dem Erfolgskriterienkatalog von Jahn und d'Hoedt (1992), untersucht. Die Erfolgswahrscheinlichkeit lag hier auch wieder bei 93%.

Oliva et al. (2007) untersuchten in ihrer Studie 36 Patienten mit einem Durchschnittsalter von ungefähr 50 Jahren mit insgesamt 100 Zirkoniumdioxidimplantaten. Die Implantate hatten 2 verschiedene raue Oberflächen. Nach einem Jahr lag die Erfolgsquote bei 98%. Aus ihren Ergebnissen zog die Arbeitsgruppe den Schluss, dass Zirkoniumdioxidimplantate mit aufgerauten Oberflächen als Zahnersatz genutzt werden können. Allerdings sind noch weitere klinische Studien nötig, um den Langzeiterfolg dieser Implantatoberflächen beurteilen zu können.

1.4.1. Biokompatibilität von Zirkoniumdioxid

2000 untersuchten Kim et al. (2000) in wie weit Zirkoniumdioxid seine Umgebung im Organismus beeinflusst, aber sie fanden weder eine Zytotoxizität gegenüber den Fibroblasten noch gegenüber dem umliegenden Weichgewebe. Aufgrund der guten

Biokompatibilität des Zirkoniumdioxids empfohlen sie das Material in medizinischen Bereichen einzusetzen.

Bei den Untersuchungen von Aldini et al. (2002; 2004) kam es durch den Kontakt mit Zirkoniumdioxid zu keiner Zytotoxizität *in vitro* und keiner immunologischen Sensibilisierung.

Y-TZP Keramiken, also teilstabilisierte polykristalline tetragonale Zirkonoxide, welche auf einer Yttriumoxid-Basis stabilisiert wurden, zeigen laut der Studie von Covacci et al. (1999) *in vitro* keinerlei mutagenes Potenzial oder eine onkogene Wirkung. Aus diesem Grund wird es auch für den Einsatz in der Medizin empfohlen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Werkstoff Zirkoniumdioxid gut biokompatibel ist, ohne dabei mutagene, toxische oder allergene Wirkungen hervorzurufen.

1.5. Der Implantat-Mukosa Kontakt

Da dentale Implantate, im Gegensatz zu vielen anderen Implantaten, ein Epithel durchdringen, haben sie eine besondere Stellung. Der Kieferknochen muss wegen dieser Durchdringung des schützenden Epithels von der Mundhöhle separiert werden. Nur wenn dies gewährleistet ist, kann es zu einem Langzeiterfolg des Implantates kommen (Brånemark et al. 1985; McKinney et al. 1988).

Zwischen dem Parodont und der periimplantären Mukosa gibt es Ähnlichkeiten, die bereits in Humanstudien (Lekholm et al. 1986b; Akagawa et al. 1989; Mackenzie & Tonetti 1995), aber auch in *in vitro* Studien und auch Tierstudien (Schroeder et al. 1981; McKinney et al. 1988; Berglundh et al. 1991; Listgarten et al. 1991), untersucht und beschrieben wurden. Bindegewebe und darüber liegende epitheliale Strukturen, bestehend aus einem oralem Epithel, einem Sulkus- und einem Saumepithel, bilden die 2 Schichten, aus denen das periimplantäre Weichgewebe aufgebaut ist. Dies entspricht auch dem Aufbau des Parodonts. Daraus ergibt sich, dass man zwischen einem epithelalem Implantat-Mukosa-Kontakt bzw. epithelalem Attachment und einem bindegewebigem Implantat-Mukosa-Kontakt bzw. bindegewebigem Attachment differenzieren kann (siehe Abbildung 1, Palacci et al. 1995).

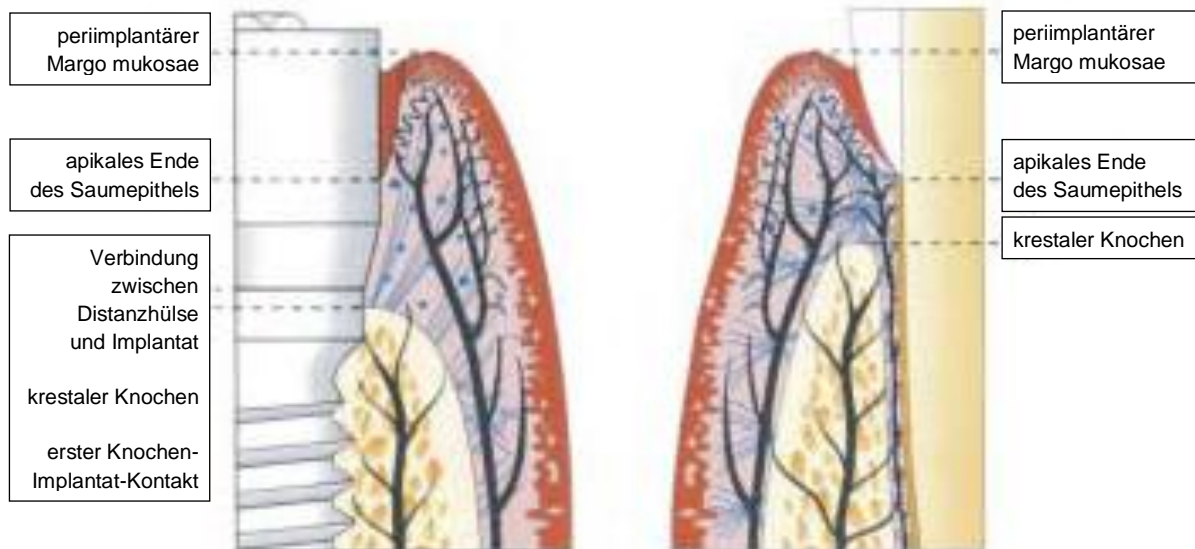


Abbildung 1: Anatomie der Hart- und Weichgewebe.

Die Abbildung zeigt die Anatomie der Hart- sowie der Weichgewebe um ein Titanimplantat ad modum Bränemark (links) und um einen gesunden Zahn. Bei dem Implantat und dem Zahn ähneln sich die epithelialen Strukturen sehr. Jedoch inserieren die periimplantären Kollagenfasern des Bindegewebes nicht perpendikulär an der Implantatoberfläche. Im Gegensatz zu der periimplantären Mukosa findet sich im Parodont eine zusätzliche Blutversorgung aus dem Desmodontalspalt (Abbildung aus Palacci et al. 1995).

1.5.1. Das epitheliale Attachment

Der epitheliale Kontakt zwischen Implantat und Mukosa unterscheidet sich von dem zwischen Zahn und Mukosa (Schroeder et al. 1981; McKinney et al. 1985; Mackenzie & Tonetti 1995; Liljenberg et al. 1997). Der koronale Abschluss des epithelialen Attachments wird von einem Saumepithel, welches aus 3 bis 7 Schichten besteht und eine innere und äußere Basalmembran besitzt, gebildet (McKinney et al. 1985). In Human- (Gould et al. 1984; Arvidson et al. 1996), *in vitro*- und Tierstudien (James & Schultz 1974; Listgarten & Lai 1975; Gould et al. 1981; McKinney et al. 1985; Kawahara et al. 1998) fand man heraus, dass das Anheften der epithelialen Strukturen an dem Implantat mit Hilfe von Hemidesmosomen erfolgt.

Der gesunde Zahn hat eine Zementschicht. Das Saumepithel des gesunden parodontalen Gewebes reicht bis an die Schmelz-Zement-Grenze. Warum das Saumepithel periimplantär nicht bis auf Knochenniveau reicht, ist noch nicht gänzlich erforscht (Berglundh et al. 1991). Nach der Insertion eines Implantats bildet sich Granulationsgewebe, welches von proliferierendem oralem Epithel überwachsen wird. Das Epithel bildet an der Oberfläche des Implantats ein Saumepithel von ca. 2 mm Länge (Listgarten 1996; Lindhe & Berglundh 1998). Es scheint so, als ob reifes

Bindegewebe das epitheliale Tiefenwachstum stärker hemmen kann als Granulationsgewebe (Squier & Collins 1981; Chehroudi et al. 1995). In ihrer Studie vermuteten Berglundh et al. (1991), dass es bei Titanimplantaten zu einer Wechselwirkung zwischen Bindegewebe und dem Titanoxid der Distanzhülsenoberfläche kommt. Diese Wechselwirkung soll das Tiefenwachstum des Epithels verhindern. Laut Mackenzie & Hill (1984) könnte allerdings auch das Nichtvorhandensein von Signalen, ausgehend vom subepithelialen Bindegewebe, die Migration des Saumepithels nach apikal stoppen. Allerdings fanden Mackenzie & Tonetti (1995) heraus, dass es möglich ist, dass ein phänotypisch stabil ausgeformtes Saumepithel proliferieren und auf Reize, ausgehend vom unterliegenden Bindegewebe, reagieren kann.

1.5.2. Das bindegewebige Attachment

Wie bereits, erwähnt unterscheidet sich das epitheliale Attachment bei einem Implantat kaum von dem des natürlichen, gesunden Zahns. Ganz anders dagegen ist es bei dem bindegewebigen Attachment. Gründe dafür sind, dass man auf dem Implantat keine Zementschicht findet und es beim Heilungsvorgang zur Bildung narbiger Strukturen kommt. Die Kollagenfasern des Parodonts insertieren in den Zement (Feneis 1952; Page et al. 1974). Bei Implantaten ist dies jedoch generell nicht der Fall (Abbildung aus Palacci et al. 1995). Das Bindegewebe um ein Implantat ist kollagenreich und narbig. Aufgrund verschiedener Studien, Humanstudien (Akagawa et al. 1989; Liljenberg et al. 1997) und auch Tierstudien (Berglundh et al. 1991; Buser et al. 1992; Ruggeri et al. 1992), weiß man heute, dass man in der Nähe des Implantats zur Oberfläche hin parallel verlaufende kollagene Fasern vorfindet. Man konnte dies für maschinierete sowie für raue Implantatoberflächen nachweisen. Ruggeri et al. (1992) bezeichnete die Kollagenfasern um den Implantathalsbereich als „zirkuläres Ligament“. Entfernt man sich etwas vom Implantat, so verlaufen die Fasern nicht mehr parallel, sondern bilden eine Art dreidimensionales Netzwerk (Berglundh et al. 1991; Buser et al. 1992; Abrahamsson et al. 1996). Tierexperimentelle Studien zeigen jedoch, dass sich Kollagenfasern an rauen Implantatoberflächen auch perpendikulär anheften können (Schroeder et al. 1981; Steflik et al. 1990). In der Nähe der Implantatoberfläche findet man zwar viele Kollagenfasern, aber dafür ist dieser Bereich so gut wie gar nicht mit Gefäßen versorgt (Buser et al. 1992; Berglundh et al. 1994; Abrahamsson et al. 1996; Moon et

al. 1999). Als zellarm wurde der Bereich um das Implantat von Buser et al. (1992) und Abrahamsson et al. (1996) definiert. Dagegen wurde diese Region von Moon et al. (1999) weiter unterteilt. Sie unterschieden in eine etwa 40 µm breite „fibroblastenreiche Zone“ mit vielen Fibroblasten und wenig Kollagenfasern und eine angrenzende 160 µm breite Zone mit einer geringeren Dichte an Fibroblasten und einer höheren an Kollagenfasern. Sie gingen davon aus, dass die fibroblastenreiche Zone besonders wichtig ist als Schutzbarriere des Knochens für die Mundhöhle. Da das Bindegewebe um das Implantat herum, im Gegensatz zu Bindegewebe um einen natürlichen und gesunden Zahn, so gut wie nicht vaskularisiert ist (Buser et al. 1992; Berglundh et al. 1994; Abrahamsson et al. 1996; Moon et al. 1999), gingen Buser et al. (1992) davon aus, dass dies der Grund für das geringere Abwehrpotential ist.

1.5.3. Die Schutzfunktion des Implantat-Mukosa-Kontaktes

Durch Zähne und auch Implantate wird eine Verbindung zwischen Knochen und Mundhöhle hergestellt. Damit es nicht zum Eindringen von z. B. Mikroorganismen in den Knochen kommt, müssen parodontale bzw. periimplantäre Gewebe eine gewisse Schutzfunktion ausüben (Seymour et al. 1989; Berglundh et al. 1992; Ericsson et al. 1992; Lang et al. 1993). Diese Schutzfunktion ist entscheidend für den Erfolg von enossalen Implantaten (Strub 1994; Ericsson 1997).

1.6. Fokale Adhäsionspunkte

Die Zelladhäsion bedingt den Erfolg des Implantats. Denn nur dann kann sich ein intaktes Gewebe etablieren. Fokalkontakte stellen eine Verbindung zwischen extrazellulärer Matrix, der Membran und dem Zytoskelett dar (Burridge et al., 1988). Die fokalen Adhäsionspunkte haben 3 Hauptaufgaben:

1. Sie dienen der Kräfteübertragung am Adhäsionspunkt.
2. Sie ermöglichen ein starkes Anheften am Substrat.
3. Von ihnen gehen verschiedene Signaltransduktionswege aus.

Integrine sind Transmembranproteine, welche sich an verschiedene Bestandteile der extrazellulären Matrix binden. Auf der zytoplasmatischen Seite besteht über Linkerproteine Kontakt zum Aktinzytoskelett. Von diesem gehen auch die Aktin-Stress-Fasern aus. Diese Fasern bestehen aus zwei verschiedenen Filamenten: dem

Aktin- und dem Myosinfilament. Die Aktin-Stress-Fasern greifen an den Kontaktpunkten an und sind dehnbar. Über den Kontakt werden verschiedene Reaktionen gesteuert. Darunter auch die Zelldifferenzierung und –proliferation, die morphologischen Veränderungen und die Migration. Die Bildung von Fokuspunkten wird auch durch den Kontakt zwischen Integrinrezeptoren und den dazugehörigen extrazellulären Matrixmolekülen und den dadurch bedingten Proteinansammlungen und deren Modifikationen hervorgerufen (Bershadsky et al., 1996). Die Studie von Geiger und Bershadsky (2001) zeigt, dass Zellen über diese Kontaktpunkte die topographischen Gegebenheiten ihrer Umgebung wahrnehmen können. In diesem Fall dienen die Kontaktpunkte auch als Mechanosensoren. Auf die Zelle wirkende Kräfte können über die Kontaktpunkte auf das Zytoskelett weitergeleitet werden (Burridge et al., 1997, Sastry und Burridge, 2000). Nach einer Implantatinsertion müssen die Zellen des umgebenden Gewebes mit Hilfe dieser fokalen Adhäsionspunkte die neue Oberfläche besiedeln.

1.6.1. Wichtige Bestandteile der fokalen Kontakte

1.6.1.1. Integrine

Integrine gehören zu den heterodimeren Transmembranrezeptoren der extrazellulären Matrix. Sie bestehen aus einer alpha und einer beta Untereinheit, welche nicht-kovalent miteinander verbunden sind. An Komponenten der extrazellulären Matrix binden Integrine spezifisch. Dies erklärt auch ihr gehäuftes Auftreten in Bereichen der Zellmembran, an welchen fokale Kontaktpunkte vorliegen. Der Teil der Integrine, der sich auf der zytoplasmatischen Seite befindet, ist mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Viele Zellen exprimieren jedoch verschieden spezifische Integrine. Ein heterodimeres Integrin kann jedoch ein oder auch mehrere extrazelluläre Matrixproteine erkennen. Auf der anderen Seite können jedoch einzelne Proteine der extrazellulären Matrix von verschiedenen Integrinen erkannt werden (Ivaska und Heino, 2000). Aufgrund der unterschiedlichen Sequenzen der Untereinheiten der Integrine auch in zytoplasmatischen Bereichen, können diese auch an zytoplasmatische Proteine binden. Dies erklärt, warum durch gleiche extrazelluläre Liganden verschiedene zelluläre Reaktionen der Integrin-Untereinheiten hervorgerufen werden (Hynes, 1992). Es gibt jedoch auch Integrin-Dimere, welche nur an einzelne spezifische extrazelluläre Matrixproteine binden.

Dadurch verändern sich die Signale, die letzten Endes ins Zytoplasma gelangen. Unterschiedliche Signale rufen verschiedene zelluläre Reaktionen hervor. Integrine sind folglich Verbindungspunkte zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett (van der Flier und Sonnenberg, 2001).

1.6.1.2. Zytoplasmatische Linkerproteine

Linkerproteine sind z. B. Vinculin, Talin, Filamin und α -Actinin. Durch sie wird eine Verbindung zwischen dem Zytoskelett und den Integrinen aufgebaut. Allerdings können an sie auch andere Moleküle binden, welche zur Signaltransduktionskaskade der Integrine gehören. Vinculin besteht aus einem Kopf- und einem Schwanzteil. Befindet es sich im inaktiven Zustand, so ist der Kopfteil intramolekular an den Schwanzteil gebunden. Diese Kopf-Schwanz-Verbindung wird durch Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) gelöst, da es zu einer Konformationsänderung kommt (Gilmore and Burridge, 1996). Nach dem Auflösen dieser Kopf-Schwanz-Verbindung, kann der Kopfteil des Vinculins an Talin und an α -Actinin binden. Im Schwanzteil des Vinculins befinden sich zwei Bindungsstellen für Aktin. Zusätzlich ist es dem Vinculin aufgrund seines carboxy-terminalen Endes möglich, sich mit diesem in die Lipiddoppelschicht einzulagern (Critchley, 2000). Auf der einen Seite dient Vinculin der Stabilisation der Talin-Aktin-Interaktion, auf der anderen Seite stabilisiert es aber auch die Interaktion zwischen Talin und der Lipiddoppelschicht. Das antiparallele Dimer Talin besitzt zwei Bindetaschen für Vinculin. Von diesen Bindetaschen werden jeweils drei Vinculinmoleküle gebunden. Die drei Vinculinmoleküle bilden einen Trimer. Talin hat jedoch noch eine zweite Bindemöglichkeit. Es kann direkt an die zytoplasmatischen Gebiete der β -Untereinheit der Integrine binden. Daher scheint es so, als ob Vinculin keine strukturgebende, sondern in erster Linie eine regulierende Funktion hat (Critchley, 2000).

1.6.2. Aufbau und Funktion der Fokalkontakte

Über die Fokalkontakte erhält die Zelle mittels einer Signalkaskade Informationen über ihre Umwelt. Diese Informationen führen dann wiederum zum Auslösen einer entsprechenden Reaktion. Auf der zytoplasmatischen Seite der Kontakte findet man Integrine sowie Signaltransduktionsproteine. Untereinander können diese

miteinander verbunden sein. So kann z. B. Vinculin an über zehn Komponenten der Kontakte binden. Diese Komponenten haben auch wieder verschiedene Bindungspartner. So ergibt sich eine sehr komplexe Interaktion zwischen den Molekülen (Geiger and Bershadsky, 2001). Auf dieser Seite der Kontakte können auch Vorgänge, wie beispielsweise eine Phosphorylierung von Proteinen zur Aktivierung von Proteinen führen, welche dann wiederum ganze Signaltransduktionsprozesse in Gang setzen. Am Ende steht dann die Reaktion der Zelle (Parsons et al., 2000). Durch die Kontraktilität der Stressfasern wird die Entstehung von fokalen Kontakten reguliert (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). Folgendermaßen stellt man sich die Bildung der Fokalkontakte vor:

Über Integrine kommt es zur Adhäsion der Zelle am Substrat. Geklustert sind die Integrine zwar nicht, aber dafür stehen sie mit den Aktinfilamenten in Kontakt. Die Aktinfilamente stehen nicht unter Spannung. Rho (eine GTPase) wird aktiviert. Daraufhin kommt es zur Aktivierung von Myosin. Was dann wiederum zur Bildung von Myosinfilamenten führt (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). Dadurch kommt es zu einer Verstärkung der Kraftwirkung auf die Aktinfilamente, wodurch sie gebündelt werden. Dies führt dann wieder zur Klusterung der Integrine, denn diese sind ja mit ihnen verbunden. Dadurch entstehen Stress-Fasern sowie Fokalkontakte (Burridge et al., 1997).

1.7. Fragestellung

Die nachfolgende Arbeit untersucht das Verhalten von Fibroblasten und Epithelzellen auf Implantatoberflächen aus einer Titanlegierung und Zirkoniumdioxid, die unterschiedlich bearbeitet wurden. So wird jeweils zwischen einer gestrahlten, einer maschinerten und einer polierten Oberfläche unterschieden. Neben dem Proliferationsverhalten und dem Adhäsionsverhalten der Zellen wird auch die Fläche der Zellen, sowie deren Ausläufer untersucht. Dabei wird auch betrachtet, wie diese Aspekte im Zusammenhang stehen. Dadurch soll herausgefunden werden, welches Substrat den Epithelzellen und Fibroblasten die beste Ausgangssituation zur Besiedelung der jeweiligen Oberfläche bietet.

2. Material und Methoden

In meinen Untersuchungen verwendete ich zwei verschiedene Zelltypen. Zum einen Fibroblasten (HGF1 (Human Gingival Fibroblast), LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland) und zum anderen Epithelzellen (8HNEpC-c (Normal Human Nasal Epithelial Cells); Cat.-No.: C-12620 PromoCell GmbH; Heidelberg, Deutschland).

Bei der verwendeten Titanlegierung handelt es sich um TiAl6V4 der Firma DeguDent aus Hanau-Wolfgang, Deutschland.

2.1. Zellkulturenreagenzien

HGF1:

Medium	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Firma GIBCO, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum	FBS (Fetal Bovine Serum) Firma GIBCO, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Trypsin-EDTA 0,05% / 0,02% n D-PBS Firma PAA, Pasching, Österreich
P/S	PenStrep Penicillin Streptomycin Firma GIBCO, Karlsruhe, Deutschland

HNEpC-c:

Medium	Airway Epithelial Cell Growth Medium PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Supplement Mix	Epithelial Cell Growth Medium PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Trypsin	0,05% Trypsin Inhibitor, 0,1% BSA PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Einfriermedium	Cryo-SFM PromoCell, Heidelberg, Deutschland

2.2. Verwendete Chemikalien

BSA	Albumin Fraktion V; $\geq 98\%$; pulv. ; bovine Albumin Fraktion V; M = 69.000 ROTH, Karlsruhe, Deutschland
DAPI	DAPI $\geq 98\%$, p.a. zur DNA-Färbung 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Detektionslösung Western Blot	Amersham TM ECL Plus Western Blotting Detection System GE Healthcare, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid	$\geq 99,9\%$ (DMSO)
Methanol	aus dem zentralen Chemielager der Universität des Saarlandes Saarbrücken, Deutschland
Paraformaldehyd	Riedel-de Haën, Seelze, Germany
PBS	Phosphate Buffered Saline (1 Tablette pro 200 ml H ₂ O) SIGMA, St. Louis, Missouri, USA
Triton	Triton X-100 SIGMA, St. Louis, Missouri, USA
Trypanblau	0,5% Trypanblau in PBS (0,1g/20ml) filtriert

2.3. Chemikalien für die Gele des Western Blots

Acrylamid	Acrylamid-Bis-Fertiglösung 40% (37; 5:1) Merck, Darmstadt, Deutschland
APS	Ammonium persulfate; 99,99+% ReagentPlus TM, Aldrich [®] , München, Deutschland
Bradford	1. Coomassie-Brillantblau: Coomassie [®] Brilliantblau G250 Firma Fluka, Buchs, Schweiz 2. EtOH: Ethanol absolut, Emprove [®] Firma Merck, Darmstadt, Deutschland 3. O-Phosphorsäure
Complete	Roche, Mannheim, Deutschland
DTT	DL-Dithiothreibe for electrophoresis $\geq 99\%$ SIGMA, St. Louis, Missouri, USA

Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris	Trizma [®] base, minimum 99,9 % titration SIGMA, St. Louis, Missouri, USA
Tris HCL	Tris Hydrochloride Firma Promega, Klaus, Österreich
NaCl	Natriumchlorid Merck, Darmstadt, Deutschland

2.4. Antikörper

Tubulin	Monoclonal Anti-Vinculin, Clone hVIN1 Produced in mouse, purified immunoglobulin SIGMA, St. Louis, Missouri, USA
Vinculin	Monoclonal Anti-alpha-Tubulin, Clone DM1A Purified Mouse Immunoglobulin SIGMA, St. Louis, Missouri, USA
Prim. Antikörper für Immunfluoreszenz	Monoclonal Anti-Vinculin, antibody produced in mouse SIGMA, St. Louis, Missouri, USA (eingesetzte Konzentration: AK:PBS / 1:50)
Sek. Antikörper für Immunfluoreszenz	DyLight TM 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA (eingesetzte Konzentration: AK:PBS / 1:400)
Sek. Antikörper für Western Blot	Goat anti-mouse IgG-HRP Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

2.5. Westernblot

Antikörper gegen Marker	Roti-Mark WESTERN, HRP-Konjugat Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland
Antikörper Maus	Goat-anti-mouse IgG-HRP, HRP-conjugated Firma Promega, Klaus, Österreich
Glycin	>= 99%, p.a. Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland

Precision Plus Protein TM Dual Color Standart	Precision Plus Protein TM Dual Color Standart Firma BioRad, München, Deutschland
Roti [®] Marker WESTERN Marker	Roti [®] Marker WESTERN Marker Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Ultra Pure Firma ICN Biomedicals, Inc., Ohio

2.6. Verwendete Geräte

Blotting Kammer	Firma BioRad, München, Deutschland
Dark Box	Intelligent Dark Box Firma Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
Elektrischer Anschluss Blotting Kammer	Power Pac 200 Firma Bio Rad, München, Deutschland
Photometer	Lambda Bio + Firma PerkinElmer, Rodgau, Deutschland
Rüttler	INFORS AG Basel, Schweiz
Sterilbank	Kojair [®] Biowizard Tampere, Finnland
Zellkulturschrank	HeraCell150 Firma Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge Primo Firma Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

2.7. Mikroskopie

konfokale Bilder	Nipkow-Scheibe Multi-Beam-Scan-Kopf CSU10, Yokogawa, Japan
aufrechtes Mikroskop	E600 Nikon, Japan
40x Objektiv	PlanFluor 1,3

Diodenarray/DPSS-Laser/Beleuchtung	405 nm (Compass405, Coherent, USA) 488 nm (Sapphire 488-30, Coherent, USA) 561nm (85-YCA-015, Melles Griot, USA) 635 nm (LDM535 Omicron Deutschland)
CCD-Kamera	Orca Hamamatsu, Japan

2.8. Weitere Materialien

Cryovial Röhrchen	CRYO.S TM Firma Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Falcon	Cellstar® Firma Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Filterpapier	Gel Blot Paper Firma Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Membran	Art. T8301 Firma Roth® – PVDF, Karlsruhe, Deutschland
Petrischale	Cellstar® Tissue Culture Dishes Firma Greiner Bio-One Frickenhausen, Deutschland In der Größe: 60 x 15 mm
Silikon	Adisil blau Firma Siladent, Goslar, Deutschland
Zellkulturflasche	Cellstar® Tissue Culture Flasks Firma Greiner Bio-One, Frickenausen, Deutschland

2.9. Computerprogramme

VoxCell.4.07.0.3	Visitech, Großbritannien
ImageJ	National Instituites of Health, Rockville Pike, Maryland, USA

2.10. Zellkultur

2.10.1. Kultivierung

Mit den Zellkulturen wurde stets unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

Zum Splitten der HGF1 sowie der HNEpC-c wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und 1 ml PBS hinzugegeben. Nach einer Einwirkzeit von einer Minute wurde dieses ebenfalls abgesaugt und 1 ml Trypsin darauf gegeben bis sich die Zellen anfangen von dem Flaschenboden zu lösen. In der Zwischenzeit wurde ein 50 ml großes Falcon mit 1 ml FBS und 19 ml Medium DMEM für die HGF1 vorbereitet. Die abgelösten Zellen wurden dann in das Falcon aufgenommen. Durch das FBS kam es auch zur Inaktivierung des davor hinzugegebenen Trypsins. Die HNEpC-c wurden in ein 10 ml großes Falcon mit dem entsprechenden Medium aufgenommen. Danach wurde das Zell-Medium-Gemisch 10 min mit 200 x g zentrifugiert. Während des Zentrifugierens wurde ein Medium-Supplement Mix-Gemisch bestehend aus 20 ml Medium und 5 µl Supplement Mix für die HNEpC-c angesetzt. Bei beiden Zelltypen wurde nach dem Zentrifugieren das Mediumgemisch abgenommen. Bei den Fibroblasten wurden die Zellen auf 2 neue 20 ml große Zellkulturflaschen mit jeweils 20 ml Medium, 2 ml FBS und 400 µl P/S aufgeteilt und dann bei 37°C und 5,0% CO₂ in den Zellkulturschrank gestellt. Den Epithelzellen wurde 7 ml Medium-Supplement Mix-Gemisch und 140 µl P/S hinzugegeben, bevor ich sie unter den gleichen Bedingungen wie bei den Fibroblasten in den Zellkulturschrank stellte.

2.10.2. Zellzählung zur Volumenbestimmung beim Aussäen der Proben

Damit die Bedingungen bei allen Proben identisch waren, wurden die Zellen nach einem standardisierten Verfahren (Neubauer-Zählkammern) gezählt. Die Zählkammern wurden jeweils mit ca. 10 µl Zellsuspension-Trypanblaugemisch gefüllt. Das Verhältnis von Volumen Zellsuspension zu Volumen Trypanblau sollte 1:1 betragen. Zum Füllen der Kammern wurde die Spitze der Pipette an einer Kante der Zählkammer angesetzt. Durch die Kapillarkräfte, welche zwischen der Kammer und dem Deckglas wirken, wurde die Suspension angesaugt. Unter dem Mikroskop konnte man dann die vier großen Quadrate der Neubauer Kammer auszählen.

Folgendermaßen lässt sich die genaue Zellzahl ermitteln:

Mittelwert der gezählten Zellen x 10.000 (Kammerfaktor) x 2 (Trypanblau) = Zellzahl/ml

2.10.3. Einfrieren der HNEpC-c

Die Zellen wurden ganz normal, wie auch beim Splitten, trypsiniert. Danach wurden sie für 10 Minuten bei 200 x g zentrifugiert und dann resuspendiert. Dazu wurde ein spezielles Einfriermedium (Cryo-SFM von der Firma PromoCell) benutzt. Der Überstand nach dem Zentrifugieren wurde abgenommen und die Zellen wurden mit dem Restüberstand in ein Cryovial-Röhrchen gegeben. Dieses Röhrchen wurde dann in einem Stickstofftank eingefroren. Da das Einfrieren und auch das Auftauen einen Stressfaktor für die Zellen darstellt und dadurch die Anzahl der Zellen verringert werden kann, wurde stets darauf geachtet, dass nur Zellen einer nicht zu hohen Passage eingefroren wurden.

2.10.4. Einfrieren der HGF1

Das Vorgehen entsprach bis zum Zentrifugieren dem der Zellkultivierung. Nach dem 10 minütigen Zentrifugieren der Zellen wurde der Überstand abgenommen. Es wurde nun DMSO (Dimethylsulfoxide $\geq 99,9\%$) hinzugegeben. Und zwar genau so viel, dass es 10% des angestrebten Volumens entsprach. Ebenfalls wurde 40% des angestrebten Volumens in Form von FCS hinzugegeben. Die Zellen mit dem DMSO-FCS-Gemisch wurden nun auf Cryovial Röhrchen gegeben und bei -80°C eingefroren.

2.11. DAPI Färbung

Pro ml Methanol wurden 20 μl DAPI zugegeben. Dieses Gemisch wurde nach vorheriger Mediumabnahme auf die Proben gegeben und dann 30 min im Zellkulturschrank einwirken gelassen. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bildet, durch seine selektive Bindung an die DNA, Komplexe, welche sehr stark fluoreszierend sind und sich unter dem Fluoreszenzmikroskop deutlich darstellen. Die minimale Anregung liegt bei 359 nm, die maximale Anregung bei 461 nm. Ich untersuchte die Proben bei einer Anregung von 405 nm unter dem Konfokalmikroskop.

2.12. Werkstoffe und Oberflächen

2.12.1. Versuchsaufbau

Zwischen dem Implantat und dem späteren Zahnersatz befindet sich ein Verbindungsstück, das sogenannte Abutment. In diesem Bereich kommt es zur Anlagerung des Weichgewebes. Meist besteht dieses Abutment aus denen von mir verwendeten Materialien (Zirkoniumdioxid (ZrO_2) oder Titanlegierung). Die ZrO_2 - und Titanlegierungszyylinder, auf welchen ich die Zellen ausgesät habe, steckten jeweils circa zur Hälfte in einem individuell hergestellten Silikonkissen. Bei dem von mir verwendeten Titan handelte es sich um eine Titanlegierung (TiAl6V4). Dies gilt im Folgenden auch für die teilweise als Titan bezeichneten und von mir untersuchten Oberflächen. Die Kissen wurden in einer Petrischale hergestellt. Um zu verhindern, dass die Kissen zu stramm in der Petrischale sitzen, wurde zuerst Wachs auf die Ränder aufgebracht. Bevor die Petrischale mit Adisil blau aufgefüllt wurde, wurden die Zylinder mit Sekundenkleber auf dem Boden der Petrischale fixiert. Die Zylinder saßen tiefer als das Silikonkissen. So war gewährleistet, dass sich die Zellen auch auf der jeweiligen Oberfläche ansiedelten. Weiter war es möglich, das entsprechende Medium, mit Pen/Strep und Kälberserum bzw. Supplement Mix angereichert, hinzuzugeben. In jedem Kissen saßen zwölf Zylinder. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer konnte ich bei jedem Versuchsansatz die Zellzahl bestimmen. Dementsprechend ließ sich die notwendige Menge an Zellsuspension ermitteln, welche für jeden Ansatz notwendig war, um eine Konzentration von 1×10^3 Zellen/Deckfläche zu erhalten. Die Silikonkissen hatten eine Größe, sodass sie ohne weiteres in Petrischalen mit einem Durchmesser von 5,5 cm passten. Als Abstandshalter zum Boden der Petrischalen dienten harte Kunststoffringe mit einem Durchmesser von circa 3,0 cm und einer Höhe von circa 0,4 cm. Um zu verhindern, dass das Medium der Zellen am Rand der Zylinder durch minimalste Ritzen durchsickert, flutete ich die Petrischale bis zum Rand des Silikonkissens mit sterilem PBS. Jeder Zylinder hatte einen Durchmesser von 3,5 mm und eine Höhe von 5,5 mm.

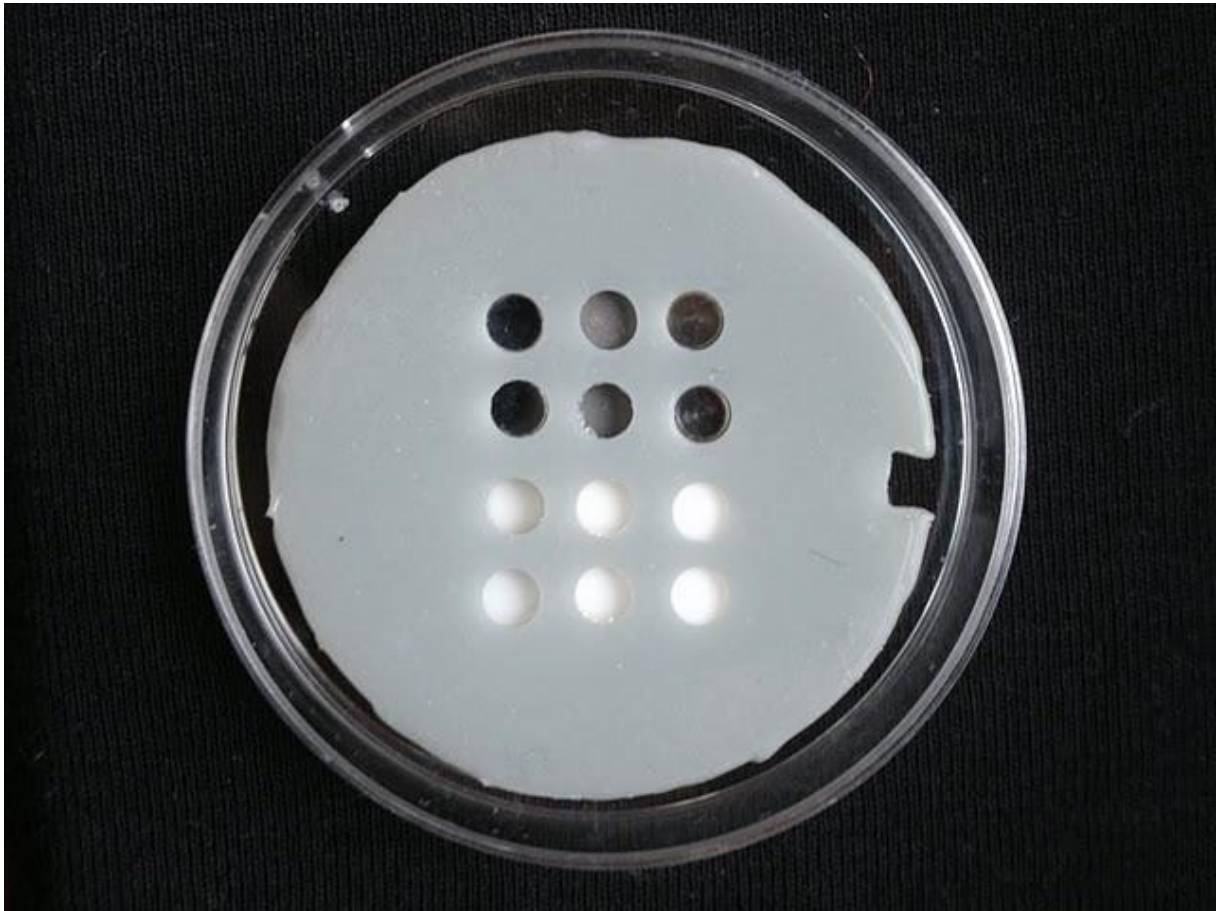


Abbildung 2: Silikonkissen mit Zirkoniumdioxid- und Titanlegierungszyylinder verschiedener Oberflächen.



Abbildung 3: Abstandshalter.

Dieser sorgt dafür, dass das Silikonkissen einen gleichmäßigen Abstand zum Boden der Petrischale hat und die Zylinder so tiefer im Silikonkissen sitzen können.

2.12.2. Oberflächenrauigkeit

Die Werkstoffe wurden hinsichtlich ihrer Oberflächenbeschaffenheit untersucht:

- Maschinerte Oberfläche: Unbearbeitete Oberfläche, wie sie sich aus der industriellen Fertigung ergeben hatte.
- Gestrahlte Oberfläche: Die Oberflächen der Titanlegierungszyylinder wurden erzeugt, indem sie für circa 2-3 Sekunden mit Aluminiumoxid (Al_2O_3) bei 2,5 bar gestrahlt wurden. Um bei den Zirkoniumdioxidzylindern eine gleiche Oberflächenbeschaffenheit zu erhalten, wurden diese dagegen für circa 2-3 Sekunden mit Al_2O_3 bei 3 bar gestrahlt.
- Polierte Oberfläche: Die Oberfläche wurde mit einem handelsüblichen Poliergummi bearbeitet.

Die Werte *Rz* stehen für die *Maximale Höhe des Rauheitsprofiles*, *Ra* meint die *Arithmetische Durchschnittsabweichung des Rauheitsprofiles*. Unter dem Punkt des

Materialanteilsparameter–Rauheitsprofils wird ein *Relatives Materialverhältnis des Rauheitsprofiles* angegeben.

Die Messungen wurden von der Firma NanoFocus (Oberhausen, Deutschland) durchgeführt. NanoFocus verwendete dazu unter Einsatz eines konfokalen Multi-Pinhole-Disc Mikroskops das µsurf explorer System.

Dabei ergaben sich folgende Werte:

<u>Titan poliert</u>	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Ø
Achse X				
Länge	4.16 mm	4.16 mm	4.17 mm	4.163 mm
Größe	2660 Punkte	2665 Punkte	2670 Punkte	2665 Punkte
Schrittabstand	1.56 µm	1.56 µm	1.56 µm	1.56 µm
Achse Y				
Länge	0.789 mm	0.784 mm	0.786 mm	0.786 mm
Größe	505 Linien	502 Linien	503 Linien	503 Linien
Schrittabstand	1.57 µm	1.57 µm	1.57 µm	1.57 µm
ISO 4287				
Amplituden-Parameter-Rauheitsprofil				
Rz	0.0395 µm	0.0256 µm	0.0289 µm	0.0313 µm
Ra	0.00635 µm	0.00484 µm	0.00448 µm	0.0052 µm
Materialanteilsparameter-Rauheitsprofil				
Rmr	0.2 %	0.599 %	0.2 %	0.201 %

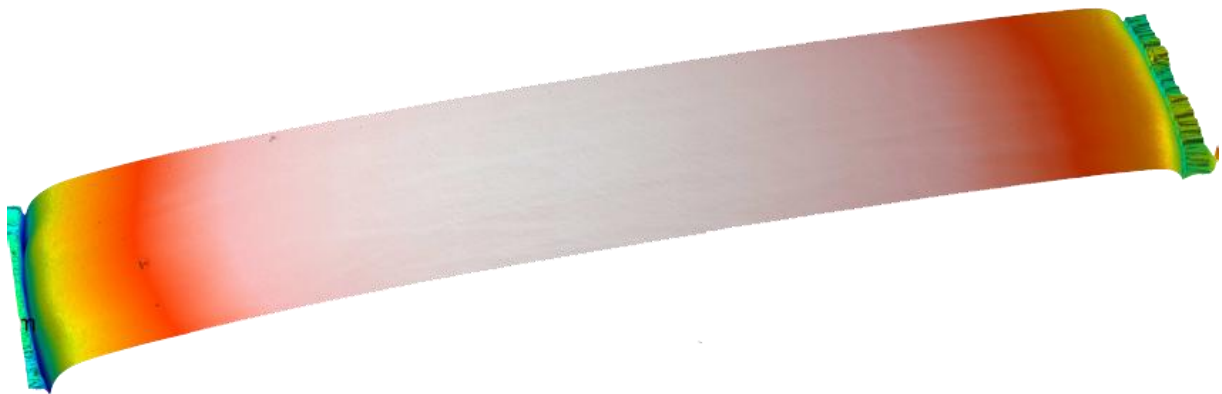


Abbildung 4: Oberfläche poliertes Titan.
Der durchschnittliche Rz-Wert liegt bei 0.0313 µm.

<u>Titan maschinert</u>	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Ø
<i>Achse X</i>				
Länge	4.17 mm	4.19 mm	4.17 mm	4.176 mm
Größe	2670 Punkte	2679 Punkte	2668 Punkte	2672 Punkte
Schrittabstand	1.56 µm	1.56 µm	1.56 µm	1.56 µm
<i>Achse Y</i>				
Länge	0.758 mm	0.758 mm	0.758 mm	0.758 mm
Größe	485 Linien	485 Linien	485 Linien	485 Linien
Schrittabstand	1.57 µm	1.57 µm	1.57 µm	1.57 µm
<i>ISO 4287</i>				
<i>Amplituden-Parameter-Rauheitsprofil</i>				
Rz	76.2 nm	61.1 nm	0.1 µm	0.08 µm
Ra	13 nm	11.4 nm	0.0171 µm	8.139 µm
<i>Materialanteilsparameter-Rauheitsprofil</i>				
Rmr	0.2 %	0.2 %	0.201 %	0.2 %

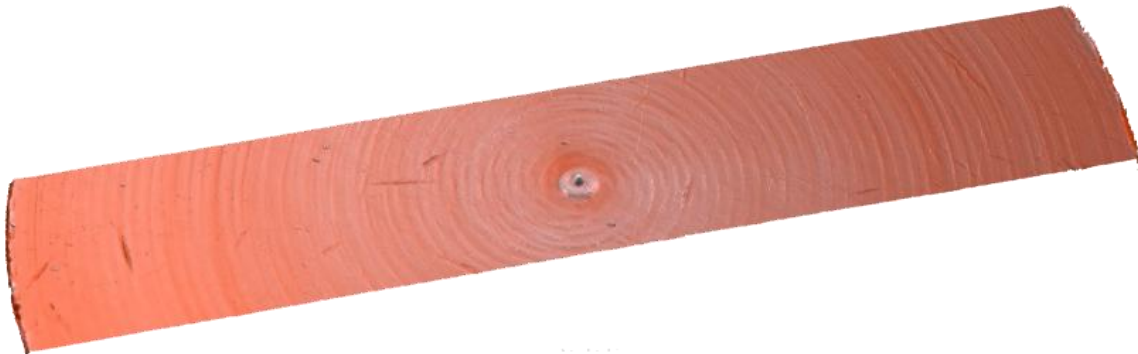


Abbildung 5: Oberfläche maschinertes Titan.
Der durchschnittliche Rz-Wert liegt bei 0.08 µm.

<u>Titan gestrahlt</u>	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Ø
Achse X				
Länge	4.17 mm	4.19 mm	4.18 mm	4.18 mm
Größe	2668 Punkte	2684 Punkte	2676 Punkte	2676 Punkte
Schrittabstand	1.56 µm	1.56 µm	1.56 µm	1.56 µm
Achse Y				
Länge	0.759 mm	0.758 mm	0.759 mm	0.7587 mm
Größe	486 Linien	485 Linien	486 Linien	486 Linien
Schrittabstand	1.57 µm	1.57 µm	1.57 µm	1.57 µm
ISO 4287				
Amplituden-Parameter-Rauheitsprofil				
Rz	4.6 µm	5.13 µm	3.85 µm	4.5267 µm
Ra	0.901 µm	0.939 µm	0.848 µm	0.896 µm
Materialanteilsparameter -Rauheitsprofil				
Rmr	0.2 %	0.2 %	0.2 %	0.2 %

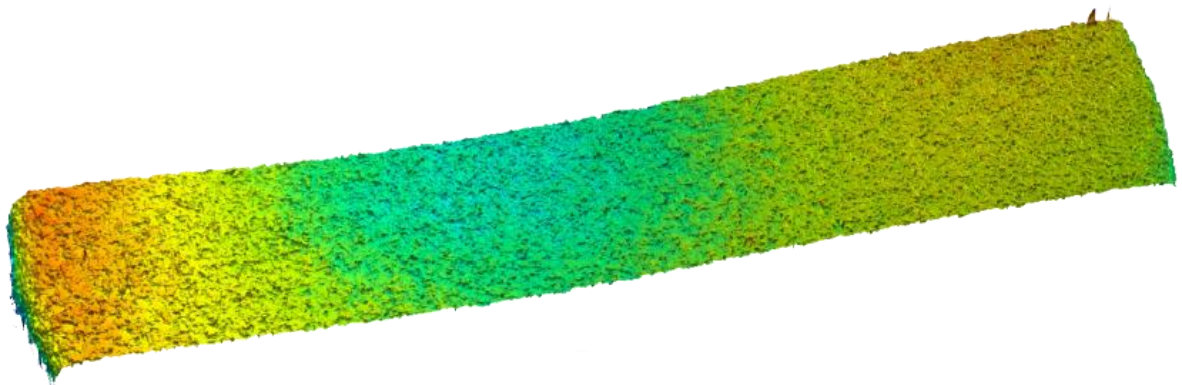


Abbildung 6: Oberfläche gestrahltes Titan.
Der durchschnittliche Rz-Wert liegt bei 4.5267 µm.

<u>Zirkoniumdioxid poliert</u>	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Ø
Achse X				
Länge	4.18 mm	4.18 mm	4.16 mm	4.173 mm
Größe	2675 Punkte	2675 Punkte	2665 Punkte	2672 Punkte
Schrittabstand	1.56 µm	1.56 µm	1.56 µm	1.56 µm
Achse Y				
Länge	0.789 mm	0.786 mm	0.781 mm	0.7853 mm
Größe	505 Linien	503 Linien	500 Linien	503 Linien
Schrittabstand	1.57 µm	1.57 µm	1.57 µm	1.57 µm
ISO 4287				
Amplituden-Parameter-Rauheitsprofil				
Rz	40.6 nm	0.0902 µm	14.9 nm	0.047 µm
Ra	5.18 nm	0.0128 µm	2.71 nm	6.9 nm
Materialanteilsparameter-Rauheitsprofil				
Rmr	0.2 %	0.2 %	0.2 %	0.2 %

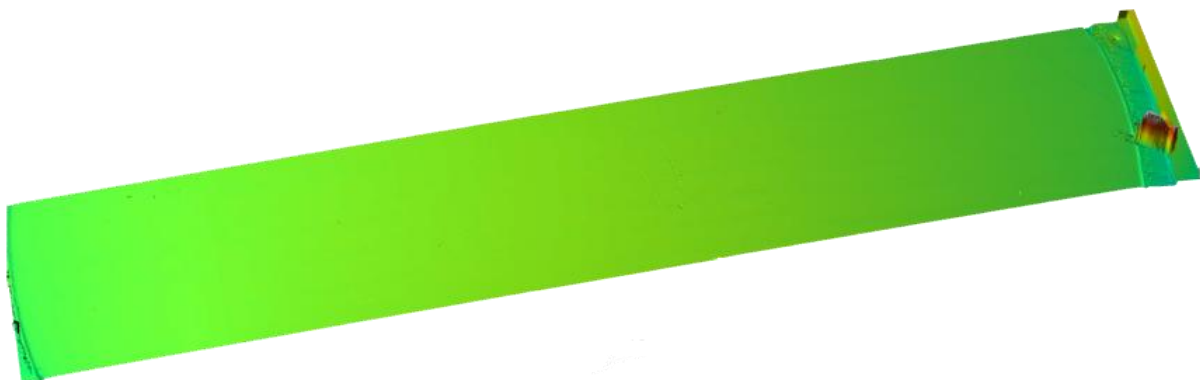
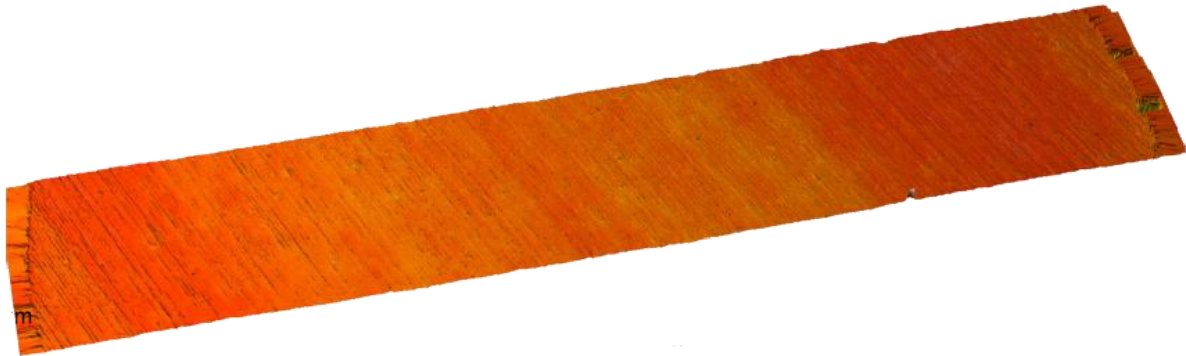


Abbildung 7: Oberfläche poliertes Zirkoniumdioxid.
Der durchschnittliche Rz-Wert liegt bei 0.047 µm.

<u>Zirkoniumdioxid maschinert</u>	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Ø
<i>Achse X</i>				
Länge	4.17 mm	4.17 mm	4.19 mm	4.1767 mm
Größe	2669 Punkte	2669 Punkte	2681 Punkte	2673 Punkte
Schrittabstand	1.56 µm	1.56 µm	1.56 µm	1.56 µm
<i>Achse Y</i>				
Länge	0.758 mm	0.758 mm	0.759 mm	0.7583 mm
Größe	485 Linien	485 Linien	486 Linien	485 Linien
Schrittabstand	1.57 µm	1.57 µm	1.57 µm	1.57 µm
<i>ISO 4287</i>				
<i>Amplituden-Parameter-Rauheitsprofil</i>				
Rz	0.252 µm	0.284 µm	0.346 µm	0.294 µm
Ra	0.0534 µm	0.0567 µm	0.0718 µm	0.0606 µm
<i>Materialanteilsparameter-Rauheitsprofil</i>				
Rmr	0.2 %	0.2 %	0.2 %	0.2 %



**Abbildung 8: Oberfläche maschinertes Zirkoniumdioxid.
Der durchschnittliche Rz-Wert liegt bei 0.294 µm.**

<u>Zirkoniumdioxid gestrahlt</u>	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Ø
Achse X				
Länge	4.19 mm	4.16 mm	4.17 mm	4.173 mm
Größe	2680 Punkte	2665 Punkte	2669 Punkte	2671 Punkte
Schrittabstand	1.56 µm	1.56 µm	1.56 µm	1.56 µm
Achse Y				
Länge	0.758 mm	0.758 mm	0.758 mm	0.758 mm
Größe	485 Linien	485 Linien	485 Linien	485 Linien
Schrittabstand	1.57 µm	1.57 µm	1.57 µm	1.57 µm
ISO 4287				
Amplituden-Parameter-Rauheitsprofil				
Rz	1.49 µm	1.77 µm	1.58 µm	1.6133 µm
Ra	0.349 µm	0.413 µm	0.353 µm	0.3717 µm
Materialanteilsparameter-Rauheitsprofil				
Rmr	0.2 %	0.2 %	0.2 %	0.2 %

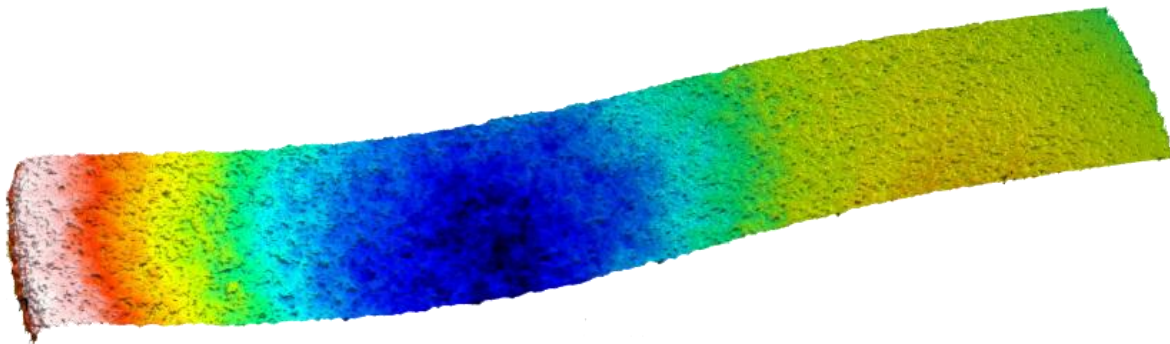


Abbildung 9: Oberfläche gestrahltes Zirkoniumdioxid.
Der durchschnittliche Rz-Wert liegt bei 1.6133 µm.

2.13. Kontrollversuche

Um zu verhindern, dass Fehler bei der Kultivierung der Primärzellen zu einer Verfälschung der Ergebnisse führten, säte ich die Fibroblasten, wie auch die Epithelzellen, zusätzlich auf den Deckflächen von Kontrollzylindern aus Kunststoff aus. Diese Deckflächen hatten eine einheitliche Oberflächenbeschaffenheit. Der Versuchsaufbau glich dabei dem der Zirkoniumdioxid- und Titanlegierungszylinder.

Zusätzlich gab ich jeweils die einzelnen Bestandteile des Versuchsaufbaus (Zylinder, Abstandshalter und Silikonkissen) in verschiedene Zellkulturflaschen, um zu beobachten, ob diese das Wachstum der Epithelzellen oder der Fibroblasten beeinflussen. Das Wachstum beider Zelltypen wurde dadurch jedoch nicht beeinflusst.

2.14. Immunfluoreszenzmikroskopie

Die bei der Immunfluoreszenz-Mikroskopie verwendeten Antikörper werden bzw. sind mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt. Bei der Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge wird dieses Licht selektiv von den Fluoreszenzfarbstoffen absorbiert und spektral verschoben als Emissionslicht wieder abgegeben. Somit lässt sich der Antikörper unter dem Mikroskop erkennen und ggf. farblich unterscheiden.

Es wird zwischen einer direkten Immunfluoreszenz- und einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung unterschieden. Bei der direkten Methode ist ein Primärantikörper an den Farbstoff gekoppelt, bei der indirekten sind dagegen Sekundär- oder Tertiärantikörper an den Farbstoff gekoppelt. In beiden Fällen kann ein Epitop und dadurch auch ein bestimmtes Protein sichtbar gemacht werden. Ich verwendete bei meinen Untersuchungen die indirekte Methode.

Sofern nicht extra erwähnt, erfolgten alle Arbeitsschritte unter nicht sterilen Bedingungen und bei Raumtemperatur.

Zuerst wurde das Medium abgenommen, die Zylinder in das Silikonkissen gedrückt und dann die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden sie für 10 Minuten in 4% Paraformaldehyd (PBS) fixiert. Als nächstes wurden die Zellen 3 x 5 Minuten lang mit PBS gewaschen. Dabei standen sie auf dem Rüttler. Da eine intrazelluläre Färbung gemacht wurde, wurden die Zellen als nächstes für 10 Minuten mit 0,2% Triton X-100 permeabilisiert. Die Zellen wurden nun in einem zweiten Waschschrift 3 x 5 Minuten lang mit PBS auf dem Rüttler gewaschen. Zur Permeabilisierung der Membran und damit der Antikörper eindringen kann, wurde nun für 10 Minuten NGS (Konzentration: NGS:PBS / 1:100) auf die Zellen gegeben. Nun wurde der primäre Antikörper (Konzentration: Antikörper:PBS / 1:50) für 30 Minuten bei 37°C zur Inkubation hinzugegeben. Überschüssige Antikörper wurden dann durch 3 x 5 Minuten langes Waschen mit PBS auf dem Rüttler entfernt. Ab der Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Konzentration: Antikörper:PBS / 1:400) wurde nur noch im Dunkeln

gearbeitet. Nachdem der sekundäre Antikörper auf die Zellen gegeben worden war, wurden diese wieder für 30 Minuten bei 37°C im Zellkulturschrank gelagert. Als Letztes wurden die Zellen wieder 3 x 5 Minuten lang mit PBS auf dem Rüttler gewaschen.

2.15. Extraktion der Proteine

Als erstes wurde ein Extraktionspuffer, bestehend aus Tris-HCl, NaCl, Complete, Triton-X-100 und DTT hergestellt. Die Salze Tris-HCl und NaCl dienen der Stabilisation. Der Proteaseinhibitor aus Complete sorgte dafür, dass die Proteine nicht aufgespalten wurden. Triton-X-100 sorgte für ein Auflösen der Membran und DTT löste Disulfidbrücken auf.

Protokolle für Puffer:

5-fach Extraktionspuffer	500 mM Tris HCL 500 mM NaCl pH 7,5
Extraktionspuffer	100 µl 5-fach Extraktionspuffer 20 µl Complete 2,5 µl Triton-X-100 10 µl DTT 367,5 µl H ₂ O

Die Zellpellets wurden in diesen Extraktionspuffer aufgenommen und bei 13 000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen. Die Zellen waren somit extrahiert.

2.15.1. Proteinkonzentration nach Bradford

Der Farbstoffbindetest (Bradford 1976) wurde durchgeführt, um die Gesamtproteinkonzentration zu bestimmen und daraus wiederum die relative Proteinmenge, die zur Beladung der Gele des Western Blots notwendig war. Da der Farbstoff Coomassie-Brillantblau G 250 mit basischen Aminosäuren reagierte, kam es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm. Die

Eichgrade wurde mit entfettetem BSA 0-100 µg ermittelt. Dazu wurde BSA in einer Konzentration von 10 µg/µl in H₂O gelöst. Von jeder Proteingruppe wurden zwei Proben ermittelt. Es wurden jeweils 500 µl Bradford-Lösung mit 497 µl H₂O und 3 µl Proteinüberstand versetzt. Dies wurde dann bei 595 nm im Photometer (Lambda Bio) gemessen. Mit Hilfe dieser Werte ließ sich die relative Proteinmenge ermitteln, welche auf ein SDS-Gel aufgetragen werden musste, um die gleichen Proteinmengen zu erhalten.

Formel zum Ausrechnen der Konzentration:

Durchschnitt der Extinktion x 80 : 3 [µg/µl]

2.16. Western-Blot

Der Western-Blot ist ein Antikörpertest, welcher der Kontrolle dient. Man testet hiermit, ob der Antikörper wirklich das gewünschte Protein anfärbt. Die Proteine werden bezüglich ihrer Ladung und Größe aufgetrennt und auf der Membran finden sich später verschiedene Banden. Die spezifischen Antikörper binden dann an das entsprechende Protein und man erhält eine gefärbte Bande auf der Membran. Entspricht die gefärbte Bande, dem gewünschten Protein, so kann man sicher sein, dass der Antikörper auch an das richtige Protein bindet.

Prinzip:

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird durchgeführt, um aus den Lysaten die Proteine bezüglich ihrer Größe aufzutrennen. Die Molekularmasse wird bestimmt und die Proteingemische aufgetrennt. SDS (Natriumdodecylsulfat) denaturiert die Proteine und bindet sehr stark an sie. Zudem besitzt es einen sehr anionischen Charakter. Zwischen SDS und den Proteinen bilden sich Komplexe aus. Pro g Protein binden ca. 1,4 g Detergens. So erhalten alle Proteine eine negative Ladung und deshalb wandern die Komplexe während der Elektrophorese Richtung Anode. Über das Trenngel wurde noch ein Sammelgel gelegt und somit wurde die Auflösung der Proteinbanden verstärkt. Beide Gele besitzen unterschiedliche pH-Werte und die Bestandteile der einzelnen Gele liegen, wie im Protokoll beschrieben, in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Dadurch werden die Proteine in engen Banden konzentriert, bevor sie im Trenngel weiter aufgetrennt werden.

Protokolle für Gele und Puffer:

Trenngel 10%	4,8 ml H ₂ O 2,6 ml 1,5M Tris + 0,4% SDS 2,5 ml Acrylamid 40% 100 µl APS 10% 4 µ TEMED
Sammelgel 5%	1,8 ml H ₂ O 315 µl Acrylamid 40% 340 µl 0,5 M Tris + 0,4% SDS 25 µl APS 10% 2,5 µl TEMED
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS pH 8,3

Vor dem Gießen der Gele wurden die Glasplatten, zwischen welchen die Gele gegossen wurden, mit Ethanol gereinigt. Bevor die Platten in den Gießrahmen eingespannt wurden, mussten die Spacerplatte und die kleinere Platte so aufeinander gestellt werden, dass sie an den Rändern dicht abschlossen. Die kleinere Platte zeigte nach vorne. Das Trenngel wurde vorsichtig und blasenfrei zwischen die beiden Platten gegossen und bis ungefähr 2 cm vor dem oberen Rand aufgefüllt. Um während der Polymerisation bei Raumtemperatur ein Austrocknen zu verhindern, wurde Isopropanol darauf gegeben. Nachdem das Trenngel fertig polymerisiert war, wurde das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel bis zum oberen Rand zwischen die Glasplatten gegossen. Danach wurde der Kamm zur Bildung der einzelnen Taschen eingesteckt und das Gel polymerisierte bei Raumtemperatur.

Nach dem Einspannen der Gele und dem Befüllen der Apparatur mit SDS-Laufpuffer, wurden die Taschen mit den entsprechenden Proben, bestehend aus Proteinen, H₂O und 6x Puffer, gefüllt. Insgesamt hat jede Tasche ein Fassungsvermögen von 15 µl. Das Ganze wurde dann für ca. 2 Stunden bei 120 V laufen gelassen.

2.16.1. Proteintransfer nach Western-Blot

Wenn die Proteine mit Hilfe einer SDS-Page und der Gelelektrophorese aufgetrennt worden sind, müssen sie auf eine Membran übertragen werden. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden die Proteine auf die Blot-Membran übertragen. Dabei entsteht ein Bandenmuster, welches dem auf dem Original-Gel entspricht (Burnette 1981).

Protokoll:

Die Blotting-Kammer wurde mit Transferpuffer geflutet und die Transferkammern beidseitig mit 2 Schwämmen und 2 Filterpapieren ausgelegt. In die Mitte kamen das Gel und die Membran. Es wurde darauf Wert gelegt, dass alle Materialien mit Transferpuffer benetzt waren und sich keine Luftblasen zwischen Gel, Membran und Filterpapier befanden. Das Sandwich in der Blotting-Kammer musste nun mit der Seite, auf der sich die Membran befindet, in Richtung Kathode eingebaut werden. Nachdem die Kammer abgedeckt war, wurde das elektrische Feld angelegt. Bei 120 mA lief der Transfer über Nacht.

Protokolle für die Puffer:

Protokoll Transfer-Puffer	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	20% MetOH

Protokoll Waschpuffer (PBS-T)	1 PBS pro 200 ml H ₂ O
	0,1% (v/v) Tween-20

Am nächsten Morgen konnte der Blot abgebaut und die Membran herausgenommen werden. Die Membran wurde nun bei Raumtemperatur für eine Stunde in Waschpuffer mit 5 % Magermilch auf dem Rüttler gewaschen. Das Magermilchpulver im Waschpuffer diente dazu, freie Bindungsstellen der Membran zu blockieren. Dadurch konnten sich die später hinzugegebenen Antikörper nur noch dort anheften, wo die Proteine saßen.

Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper. Die Antikörper, hier Vinculin und Tubulin, wurden im Verhältnis 1:2000 mit Waschpuffer mit 1% Magermilch angesetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran

gegeben. Um überschüssige Antikörper wegzuspülen, wurde die Membran dann nach dreimaligen kurzen Schwenken in Waschpuffer 2 x 5 Minuten mit Waschpuffer auf dem Rüttler gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Angesetzt wurde dieser pro Membran mit 5 ml Waschpuffer mit 1% Magermilch, 2 µl Roti-Mark WESTERN und 0,2 µl goat-anti-mouse IgG-HRP. Der sekundäre Antikörper wurde eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran belassen. Bevor die Detektionslösung aufgetragen werden konnte, musste die Membran wieder nach dreimaligen kurzen Schwenken in Waschpuffer für 2 x 5 Minuten bei Raumtemperatur zum Waschen auf den Rüttler. Nachdem sich die Detektionslösungen aus dem Kühlschrank auf Raumtemperatur erwärmt hatten, wurden diese nach Anwendungsvorschrift im Verhältnis 40:1 gemischt. Pro cm² benötigte ich ca. 0,1 ml Detektionslösung. Diese wirkte nun 5 Minuten lang bei Raumtemperatur auf die Membran ein. Nachdem die Detektionslösung von der Membran abgelaufen war, konnte die Membran mit der Proteinseite nach oben in die Darkbox gelegt werden.

2.17. Konfokale Mikroskopie

Das Zählen der Zellen nach der DAPI-Färbung, das Ausmessen der Zellflächen und deren Ausläufer sowie das Auswerten der Antikörperfärbung erfolgten in unterschiedlichen Versuchsansätzen mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops. Die Verwendung eines Durchlichtmikroskops ist nicht möglich, da die Zellen auf den Deckflächen nicht-transparenter Zylinder wachsen. Aus diesem Grund ist auch ein aufrechtes Mikroskop notwendig, um die Zellen von „oben“ zu sehen. Gleichzeitig sollten die Zellzahlen, Flächen, Ausläufer und die Antikörperfärbung beispielhaft über digitale Bilder dokumentiert werden. Diese Anforderungen wurden von den zur Verfügung stehenden Mikroskopen nur von dem beschriebenen Konfokalmikroskop erfüllt.

Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie können auch dickere Objekte (z. B. Zellen) räumlich genau aufgelöst werden. Laser senden Licht mit exakt definierten Wellenlängen aus und werden hier als Lichtquelle verwendet. Generell lässt sich sagen, dass der Laserstrahl durch eine Blende tritt, dann von einem Farbteiler umgelenkt und auf das Objekt geleitet wird. Von dem Objekt wird ein Fluoreszenzlicht emittiert, welches den Farbteiler passieren kann. Es trifft dann auf eine Lochblende („pinhole“). Hinter dieser Lochblende sitzt ein Detektor. Die

Lochblende sorgt dafür, dass Licht von außerhalb der Fokusebene ausgeblendet wird. Dadurch wird erst die Konfokalität erreicht. Wird der Durchmesser der Lochblende verändert, so führt dies zu einer Veränderung der Konfokalität. Das heißt also, es kommt zu einer Veränderung der Bildaufnahmen in z-Richtung (Sheppard, 1993). Ich benutzte ein Nipkow-disk-Scanner-Mikroskop. In diesem Fall wird der Laser auf eine sich drehende Scheibe mit Mikrolinsen geleitet. Dadurch wird er in viele kleine Strahlen aufgeweitet. Die Nipkow-Disk ist eine zweite Scheibe mit spiralförmig angeordneten Pinholes, welche sich ebenfalls dreht. Auf diese Nipkow-Disk treffen dann die vielen Laserstrahlen. Nach dem Abscannen des Objektes kommt es zur Weiterleitung zur Kamera.

Bei meinen Untersuchungen benutzte ich das QLC-100 (VisiTec Int., Sunderland, UK). Es war mit zwei ORCA-ER-Kameras (Hamamatsu) ausgestattet und an einem aufrechten Nikon E600 Mikroskop angebracht. Die Detektion der DAPI-Färbung bzw. Antikörperfärbung erfolgte mit Hilfe verschiedener Laser: 405 nm (Compass405, Coherent, USA), 488 nm (Sapphire 488-30, Coherent, USA) und 561 nm (85-YCA-015, Melles Griot, USA) und 635 nm (LDM535, Omicron, Germany) zusammen mit den entsprechenden Filtersätzen. Die Aufnahmen der Zellen erfolgten durch zwei verschiedenen Objektive von Nikon. Dem Plan Fluor 20x/0.75MImm bzw. dem Fluor 40x/0.08W. Die Untersuchungen wurden bei einer Raumtemperatur von etwa 20-22°C durchgeführt.

Da das konfokale Mikroskop mit einem sensitiven Schwarz-Weiß-Detektor ausgestattet ist, entstanden auf den von mir aufgenommenen Bildern nur Grauwerte. Um die jeweiligen Strukturen möglichst deutlich darzustellen, ordnete ich den Grauwerten mit einem entsprechenden Lookup-Table Falschfarben zu. Die Fluoreszenzintensitäten werden dabei, wie in Abbildung 10 dargestellt, durch Farben codiert.

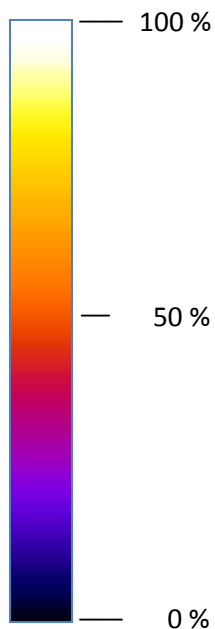


Abbildung 10: Farbcodierung des Lookup Table.
Je heller die Farbe, desto stärker die Intensität.

2.18. Statistische Auswertung

Die im Ergebnisteil ausgewerteten Daten werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SA) angegeben. Mit Hilfe des H-Tests nach Kruskal-Wallis habe ich die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ermittelt. Im Allgemeinen stellt der H-Test nach Kruskal-Wallis eine Verallgemeinerung des Wilcoxon-Rangsummentests dar, welcher sich auf mehr als zwei Stichproben bezieht. Der H-Test dient dem Vergleich der Mittelwerte mehrerer Stichproben und ist ein nicht-parametrisches Verfahren. Man sollte diesen Test vor allem dann anwenden, wenn die Messwerte entweder nicht normalverteilt oder die Varianzen der Gruppen sehr unterschiedlich sind oder beide Bedingungen vorliegen. Der H-Test ist somit eine Alternative zum F-Test, mit welchem die Varianzunterschiede zwischen zwei voneinander unabhängigen Stichproben ermittelt werden können. Der H-Test setzt folgendes voraus: die Stichproben müssen unabhängig sein, mindestens ordinalskalierte Daten und eine stetige Verteilung haben. Der H-Test nach Kruskal-Wallis zählt hinsichtlich seiner Teststärke zu den besten nicht-parametrischen Tests. Die Teststärke ist im Vergleich mit den entsprechenden Varianzanalysen befriedigend (Mikhalski et al., 2008; Quiroga et al., 2006). Zum direkten Vergleich zweier Gruppen wurde der ebenfalls nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde stets definiert als $p < 0,05$. Im

Ergebnisteil habe ich alle vorkommenden Signifikanzen zusätzlich in verschiedenen Tabellen dargestellt.

Um Hypothesen bezüglich unterschiedlicher Trends zu untersuchen benutzte ich den Spearman-Test. Dieser Korrelationstest setzt ebenfalls keine Normalverteilung der Daten voraus. Bei diesem nicht-parametrischen Test werden zwei Variablen miteinander korreliert. Dabei ergibt sich ein Korrelationskoeffizient, der lineare Zusammenhänge identifiziert. Dieser Koeffizient kann einen Wert zwischen -1 und +1 annehmen. -1 steht für einen stark negativen, +1 für einen stark positiven Zusammenhang. Liegt keine lineare Korrelation vor, so nimmt der Wert 0 an.

2.19. Zellproliferation

Ursprünglich sollte mit Hilfe eines MTT Tests die Zellproliferation gemessen werden. Nach verschiedenen Tests ergab sich jedoch, dass die Zellmenge auf den Zylindern für diese Art der Bestimmung nicht ausreichend ist.

Die Epithelzellen sowie die Fibroblasten wurden bezüglich ihrer Anzahl, Fläche, Ausläufern und Adhäsionspunkten und den Tagen 1, 3 und 5 auf den verschiedenen Werkstoffen (Titan und ZrO_2) und Oberflächen (maschiniert, gestrahlt und poliert) untersucht.

2.20. Messung der Zellflächen und Ausläuferlängen der Zellen

Des Weiteren untersuchte ich beide Zelltypen bei beiden Werkstoffen und auf allen Oberflächen bezüglich ihrer Fläche, Anzahl der Ausläufer und deren Länge. Als Ausläufer zählte ich, was ausgehend vom Zellkörper länger als breit war. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des Computerprogramms ImageJ. Dabei zeichnete ich die Begrenzung der Zelle ein. Nach vorheriger Kalibrierung errechnete das Computerprogramm dann die Fläche bzw. die Länge der Strecken. Die folgenden Bilder zeigen beispielhaft solche Messungen.

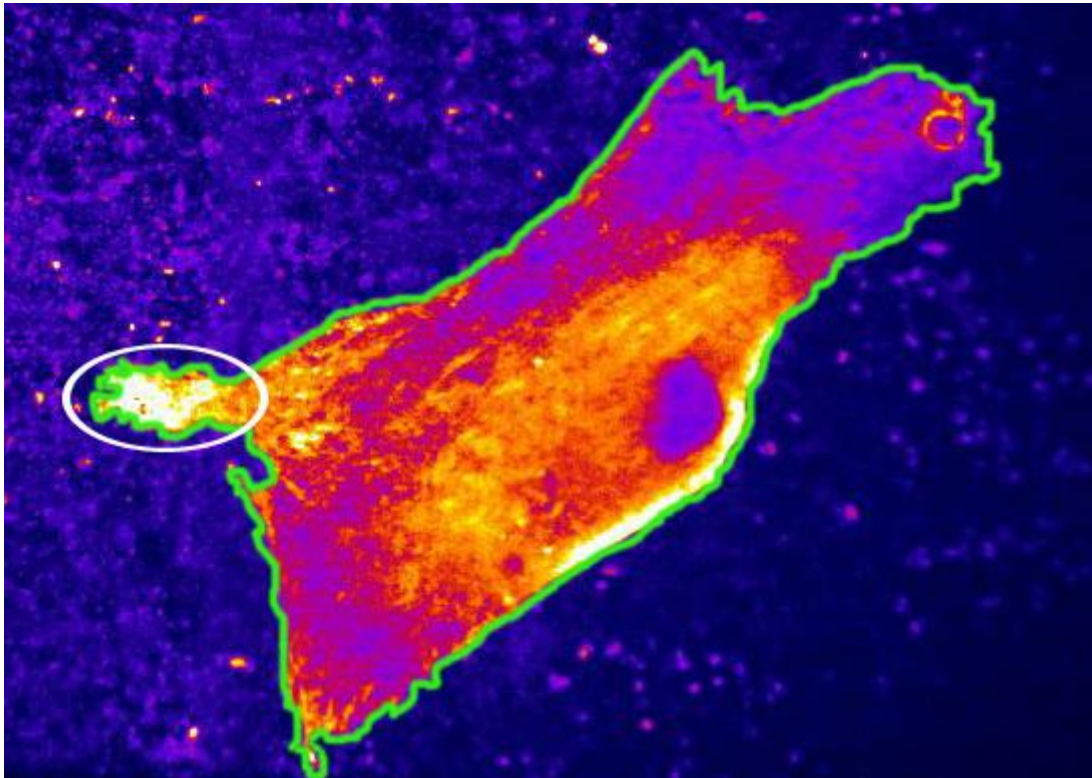


Abbildung 11: Flächenmessung einer Zelle.

Die grüne Markierung begrenzt die Fläche einer Zelle. Die weiß markierte Fläche zeigt einen Bereich der Zelle, der länger als breit ist und somit als Ausläufer zählt.

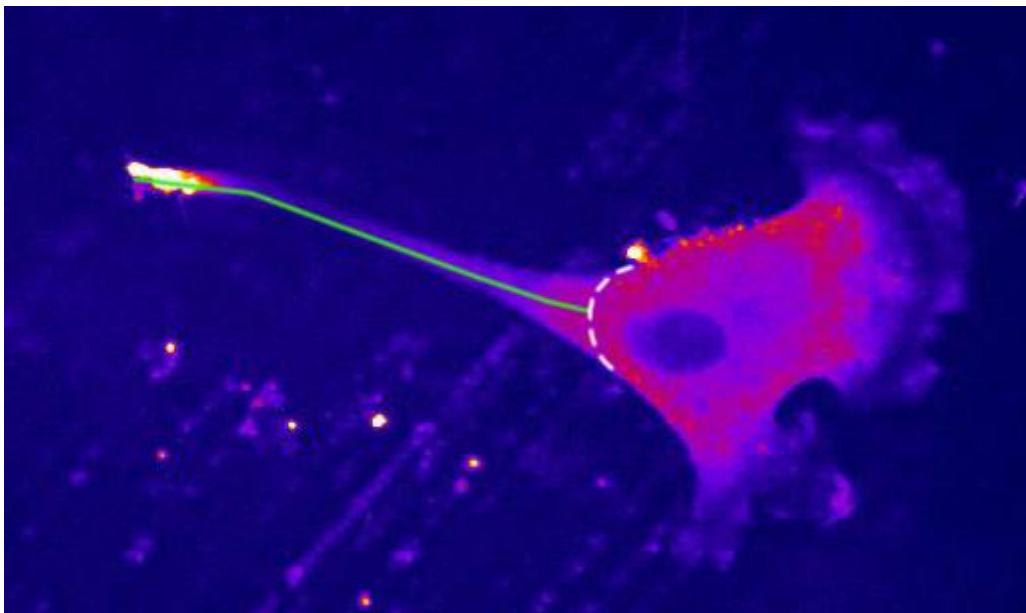


Abbildung 12: Längenmessung eines Ausläufers.

Die grüne Strecke markiert die Länge eines Zellausläufers. Die weiß gestrichelte Linie stellt den Anfang des Ausläufers dar.

3. Ergebnisse

3.1. Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen bediente ich mich der Methode nach Bradford, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Dadurch ließ sich die relative Proteinmenge ermitteln, die zur Beladung der Gele des Western-Blots notwendig waren.

Durch die Messung mit dem Photometer bei 595 nm erhielt ich folgende Werte:

Reference: 0,000

HGF1: 0,161 und 0,167

HNEpC-c: 0,075

Nach Anwendung der Formel (durchschnittlicher Extinktionswert x 80 : 3) ergaben sich folgende Konzentrationen:

HGF1: 4,37 µg/µl

HNEpC-c: 2 µg/µl

3.2. Analyse Western-Blot

Mit Hilfe des Western-Blots konnte ich spezifisch zeigen, dass man in den Epithelzellen, wie auch in den Fibroblasten, die vorher elektrophoretisch aufgetrennten Proteine Vinculin und Tubulin vorfindet. Dieser Nachweis gelang mir immunologisch, also mit Hilfe der oben genannten Antikörper. Den Western-Blot-Nachweis von Tubulin führte ich zu Kontrollzwecken durch. Hiermit wollte ich sicher gehen, dass die Methode fehlerfrei ist.

3.2.1. Nachweis von Vinculin

Abbildung 13 zeigt den von mir durchgeführten Western-Blot. Von links nach rechts lassen sich die einzelnen Geltaschen erkennen.

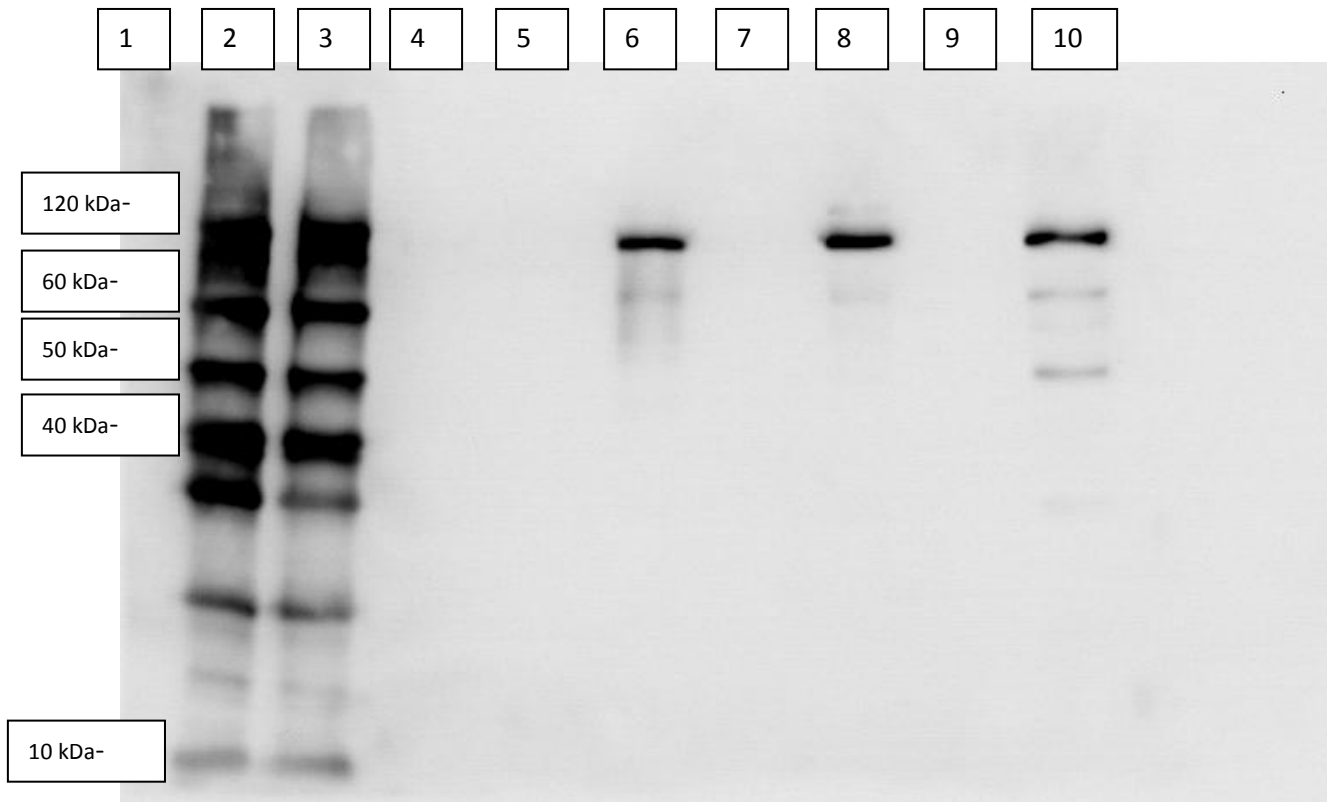


Abbildung 13: Western-Blot Vinculin.

Es ist die spezifische Bande von Vinculin bei 116 kDa bei den Epithelzellen und Fibroblasten sichtbar.

Die 10 Geltaschen habe ich wie folgt befüllt:

1. Puffer: 15 µl
2. Roti[®] Marker WESTERN Marker von der Firma Roth: 5 µl
3. Roti[®] Marker WESTERN Marker von der Firma Roth: 5 µl
4. 6x Puffer: 15 µl
5. 6x Puffer: 15 µl
6. HGF1 (0,6µl Protein + 11,4µl H₂O + 3µl 6x Puffer): 15 µl
7. 6x Puffer: 15 µl
8. HGF1 (2,3µl Protein + 9,7µl H₂O + 3µl 6x Puffer): 15 µl
9. 6x Puffer: 15 µl
10. HNEpC-c (12µl Protein + 3µl 6x Puffer): 15 µl

Bei 116 kDa ist die Bande für Vinculin zu erkennen. Sowohl bei den Epithelzellen, wie auch bei den Fibroblasten ist der Nachweis positiv.

3.2.2. Nachweis von Tubulin

Abbildung 14 zeigt den von mir durchgeführten Western-Blot. Von links nach rechts lassen sich die einzelnen Geltaschen erkennen.

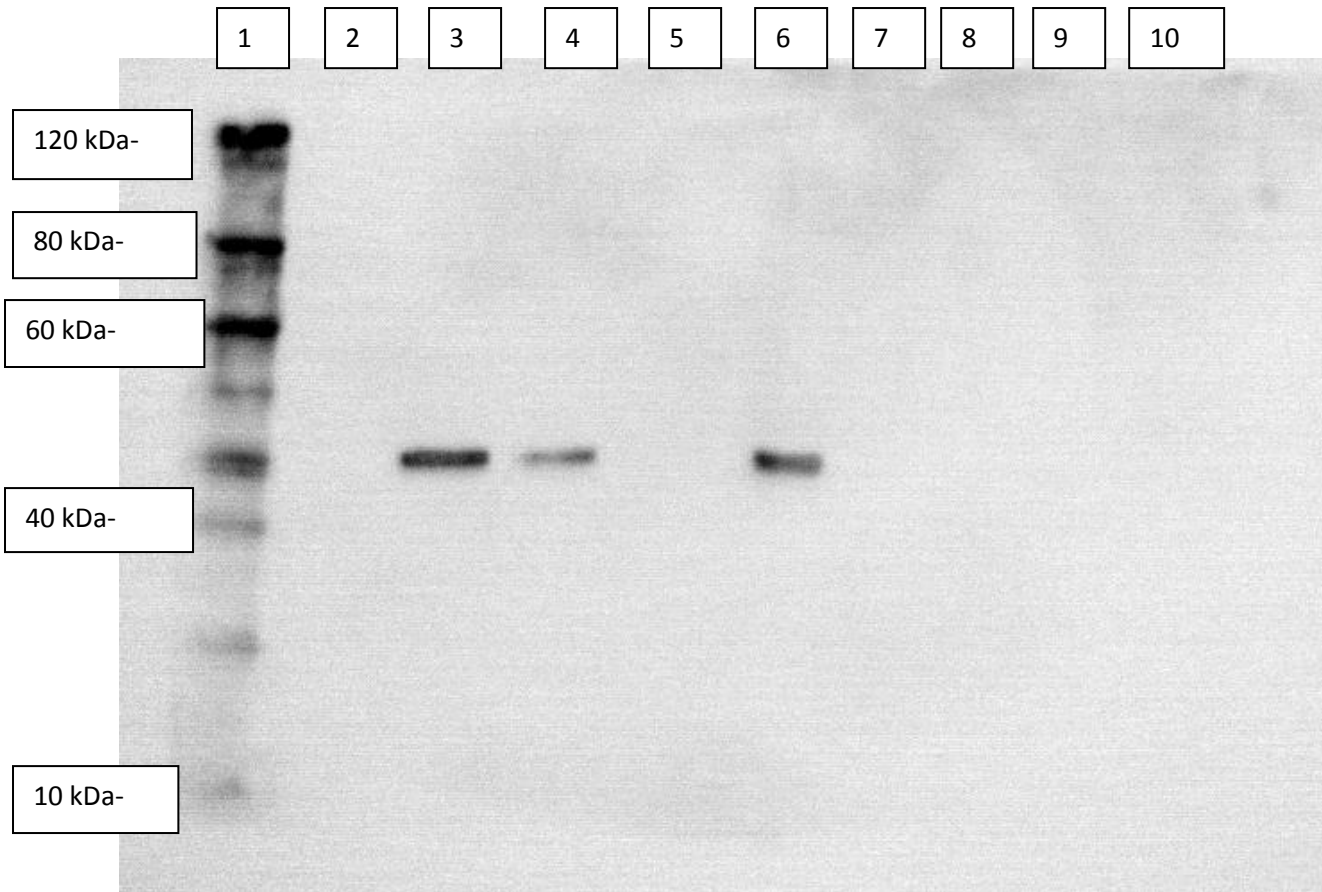


Abbildung 14: Western-Blot Tubulin.

Es ist die spezifische Bande von Tubulin bei 50 kDa bei den Epithelzellen und Fibroblasten sichtbar.

Die 10 Geltaschen habe ich wie folgt befüllt:

1. Roti[®] Marker WESTERN Marker von der Firma Roth: 5 µl
2. Precision Plus Protein TM Dual Color Standard von der Firma BioRad: 5 µl
3. HGF1 (4,6µl Protein + 7,4µl H₂O + 3µl 6x Puffer): 15 µl
4. HNEpC-c (8µl Protein + 4µl H₂O + 3µl 6x Puffer): 15 µl
5. 6x Puffer: 15 µl
6. HGF1 (1,2µl Protein + 10,8µl H₂O + 3µl 6x Puffer): 15 µl
7. HNEpC-c (12µl Protein + 3µl 6x Puffer): 15 µl
8. 6x Puffer: 15 µl
9. 6x Puffer: 15 µl
10. 6x Puffer: 15 µl

Die spezifische Bande für Tubulin ist für die Epithelzellen und die Fibroblasten bei 50 kDa zu erkennen.

3.3. Generationszeiten

Da nur auf den Kontrollzylindern aus Kunststoff ein stetiges Wachstum der Epithelzellen, wie auch der Fibroblasten, zu beobachten war, bestimmte ich mit Hilfe der auf den Kunststoffzylindern gezählten Zellen die Generationszeiten. Bei den Epithelzellen findet sich eine Verdopplung der Zellen in 32,76 Stunden +/- 1,1448. Dagegen dauert dies bei den Fibroblasten 28,392 Stunden +/- 1,068.

3.4. Zellzahl

Die Zellzahl ermittelte ich mittels der bereits beschriebenen DAPI-Färbung. Insgesamt wurde der Versuch 12-mal mit voneinander unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Die Zellen wurden ursprünglich mit einer Ausgangskonzentration von 1×10^3 Zellen/Deckfläche auf den Zylinderdeckflächen ausgesät. Um die Zellzahl zu ermitteln, wurde immer die komplette Kreisfläche des „Zylinderdeckels“ ausgezählt. Wie bereits beschrieben, habe ich jeweils mit Hilfe des H-Tests nach Kruskal-Wallis die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ermittelt. Der Einzelvergleich der Gruppen erfolgt jeweils mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests. Die Daten werden als Mittelwerte +/-Standardabweichung (SA) angegeben und im Folgenden analysiert. Die folgenden Abbildungen von Zellen sind eingefärbte Bildausschnitte aus den Originalaufnahmen und wurden von mir unter dem Aspekt der optimalen Darstellung ausgewählt und repräsentieren nicht in allen Fällen die entsprechenden Mittelwerte, welche in den Ergebnistexten genannt werden.

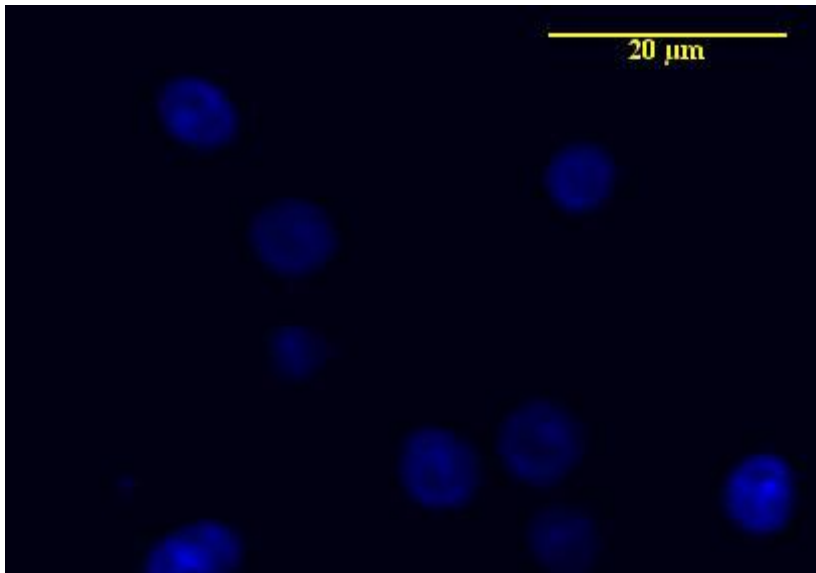


Abbildung 15: DAPI-Färbung.

Die konfokale Fluoreszenzaufnahme zeigt angefärbte Fibroblastenzellkerne.

3.4.1. Kontrollzylinder

3.4.1.1. Kunststoff, Fibroblasten

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 186 Zellen $\pm 9,3$ auf der maschinieren Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 303,3 Zellen $\pm 7,7$. Die Anzahl der Zellen stieg zum Tag 5 auf einen durchschnittlichen Wert von 514,8 Zellen $\pm 5,3$ pro Zylinderoberfläche. Man erhält einen p-Wert von 0,0073. Dies spricht für das Vorliegen einer Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; $p < 0,0001$

Tag 1 vs. Tag 5; $p < 0,0001$

Tag 3 vs. Tag 5; $p < 0,0001$

Diese Werte stehen für einen hoch signifikanten Anstieg der Zellzahl zwischen Tag 1 und 3 sowie für einen hoch signifikanten Anstieg der Zellzahl von Tag 1 auf Tag 5, und von Tag 3 auf Tag 5.

3.4.1.2. Kunststoff, Epithelzellen

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 188 Zellen $\pm 6,8$ auf der maschinieren Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 237 Zellen $\pm 8,8$. Die Anzahl der Zellen stieg zum Tag 5 auf einen durchschnittlichen Wert von 454,5 Zellen $\pm 6,6$ pro

Zylinderoberfläche. Man erhält einen p-Wert $< 0,0001$. Dies steht für eine deutliche Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,0001$

Tag 1 vs. Tag 5; $p < 0,0001$

Tag 3 vs. Tag 5; $p < 0,0001$

Diese Werte stehen für einen hoch signifikanten Anstieg der Zellzahl zwischen Tag 1 und 3 sowie für einen hoch signifikanten Anstieg der Zellzahl von Tag 1 auf Tag 5, und von Tag 3 auf Tag 5.

3.4.2. Fibroblasten

3.4.2.1. ZrO_2 , maschinert

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 258,6 Zellen $\pm 12,2$ auf der maschinerten Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 284,9 Zellen ± 37 . Die Anzahl der Zellen fiel zum Tag 5 auf einen durchschnittlichen Wert von 129,2 Zellen $\pm 8,6$ pro Zylinderoberfläche. Man erhält einen p-Wert $< 0,0001$. Dies steht für eine deutliche Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,0156$

Tag 1 vs. Tag 5; $p < 0,0001$

Tag 3 vs. Tag 5; $p < 0,0001$

Diese Werte stehen für einen signifikanten Anstieg der Zellzahl zwischen Tag 1 und 3, aber für einen hoch signifikanten Abfall der Zellzahl von Tag 1 auf Tag 5, sowie von Tag 3 auf Tag 5.

3.4.2.2. ZrO_2 , gestrahlt

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 326,8 Zellen $\pm 12,9$ auf der gestrahlten Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 383,3 Zellen ± 21 . Die Anzahl der Zellen fiel zum Tag 5 auf einen durchschnittlichen Wert von 204,2 Zellen $\pm 31,3$ pro Zylinderoberfläche. Man erhält einen p-Wert $< 0,0001$. Dies steht für eine deutliche Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; $p < 0,0001$

Tag 1 vs. Tag 5; $p < 0,0001$

Tag 3 vs. Tag 5; $p < 0,0001$

Diese Werte stehen für einen hoch signifikanten Anstieg der Zellzahl zwischen Tag 1 und 3 sowie für einen hoch signifikanten Abfall der Zellzahl von Tag 1 auf Tag 5 sowie von Tag 3 auf Tag 5.

3.4.2.3. ZrO_2 , poliert

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 275 Zellen $\pm 9,7$ auf der polierten Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 364,5 Zellen $\pm 15,5$. Die Anzahl der Zellen fiel zum Tag 5 auf einen durchschnittlichen Wert von 320,8 Zellen $\pm 25,7$ pro Zylinderoberfläche. Man erhält einen p-Wert $< 0,0001$. Dies steht für eine deutliche Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; $p < 0,0001$

Tag 1 vs. Tag 5; $p < 0,0001$

Tag 3 vs. Tag 5; $p = 0,0007$

Diese Werte stehen für einen hoch signifikanten Anstieg der Zellzahl zwischen Tag 1 und 3 sowie für einen signifikanten Anstieg der Zellzahl von Tag 1 auf Tag 5, aber einem hoch signifikanten Abfall der Zellzahl von Tag 3 auf Tag 5.

3.4.2.4. ZrO_2 , allgemein

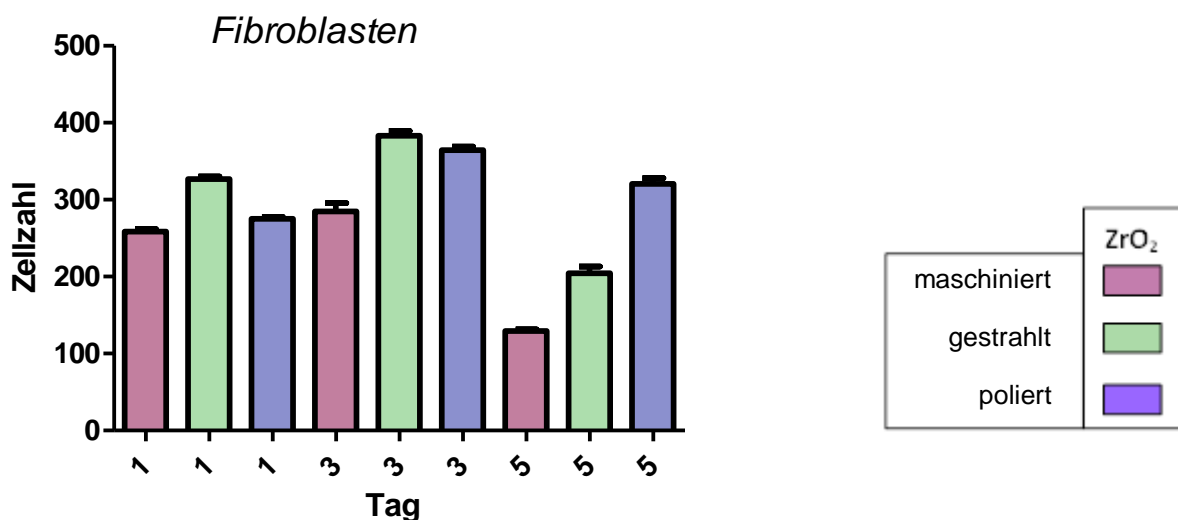


Abbildung 16: Übersicht über die Fibroblastenanzahl auf den verschiedenen Zirkoniumdioxidoberflächen an allen Messtagen.

Auf allen Oberflächen kam es von Tag 3 auf Tag 5 zu einem Abfall der Zellzahl. Signifikanzen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

HGF1, ZrO ₂ , Zellzahl		Tag 1			Tag 3			Tag 5		
		masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert
Tag 1	masch.		<0,0001	<0,0001	0,0156			<0,0001		
	gestr.			<0,0001		<0,0001			<0,0001	
	poliert						<0,0001			<0,0001
Tag 3	masch.					<0,0001	<0,0001	<0,0001		
	gestr.						0,0093		<0,0001	
	poliert									<0,0001
Tag 5	masch.								<0,0001	<0,0001
	gestr.									0,0003
	poliert									

Tabelle 1: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Zellzahl der Fibroblasten auf Zirkoniumdioxid.

Gezeigt sind Signifikanzen innerhalb der Gruppen und zwischen den einzelnen Messtagen.

Wie Abbildung 16 zeigt, erhöhte sich auf allen drei Oberflächen die durchschnittliche Zellzahl zunächst. Auf der maschinieren und gestrahlten Oberfläche fiel die Zellzahl an Tag 5, wie auch bei Titan, unter den Wert von Tag 1. Auf der polierten Oberfläche fiel die Zellzahl von Tag 3 auf Tag 5 zwar auch, jedoch lag der Wert von Tag 5 über dem von Tag 1. Auf der maschinieren Oberfläche war der Wert stets am niedrigsten. An allen Tagen bestanden im direkten Vergleich der Oberflächen signifikante Unterschiede. Tag 1: maschinieren vs. gestrahlt: $p < 0,0001$; maschinieren vs. poliert: $p < 0,0001$; gestrahlt vs. poliert: $p < 0,0001$ / Tag 3: maschinieren vs. gestrahlt: $p < 0,0001$; maschinieren vs. poliert: $p < 0,0001$; gestrahlt vs. poliert: $p = 0,0093$ / Tag 5: maschinieren vs. gestrahlt: $p < 0,0001$; maschinieren vs. poliert: $p < 0,0001$; gestrahlt vs. poliert: $p = 0,0003$).

3.4.2.5. Titan, maschinieren

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 165,7 Zellen $\pm 20,1$ auf der maschinieren Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 177,3 Zellen $\pm 24,1$. Die Anzahl der Zellen fiel zum Tag 5 auf einen durchschnittlichen Wert von 117,9 Zellen $\pm 9,2$ pro Zylinderoberfläche. Man erhält einen p -Wert $< 0,0001$. Dies steht für eine deutliche Signifikanz. Beim ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,1059$

Tag 1 vs. Tag 5; $p < 0,0001$

Tag 3 vs. Tag 5; $p < 0,0001$

Diese Werte stehen für einen nicht signifikanten Anstieg der Zellzahl zwischen Tag 1 und 3, aber für einen hoch signifikanten Abfall der Zellzahl von Tag 1 auf Tag 5 sowie auf Tag 3.

3.4.2.6. Titan, gestrahlt

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 201,9 Zellen $\pm 8,7$ auf der gestrahlten Oberfläche. An Tag 3 stieg der durchschnittliche Wert auf 242,9 Zellen $\pm 11,5$. Die Anzahl der Zellen fiel zum Tag 5 auf einen durchschnittlichen Wert von 121,1 Zellen $\pm 8,6$ pro Zylinderoberfläche. Man erhält einen p-Wert $< 0,0001$. Dies zeigt eine deutliche Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; $p < 0,0001$

Tag 1 vs. Tag 5; $p < 0,0001$

Tag 3 vs. Tag 5; $p < 0,0001$

Diese Werte bestätigen einen hoch signifikanten Anstieg der Zellzahl zwischen Tag 1 und 3 sowie für einen hoch signifikanten Anstieg der Zellzahl von Tag 1 auf Tag 5, aber einem hoch signifikanten Abfall der Zellzahl von Tag 3 auf Tag 5.

3.4.2.7. Titan, poliert

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 290,3 Zellen $\pm 15,2$ auf der polierten Oberfläche. An Tag 3 stieg der durchschnittliche Wert auf 337,1 Zellen $\pm 14,8$. Die Anzahl der Zellen fiel zum Tag 5 auf einen durchschnittlichen Wert von 167,3 Zellen $\pm 7,8$ pro Zylinderoberfläche. Man erhält einen p-Wert $< 0,0001$. Dies spricht für eine deutliche Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; $p < 0,0001$

Tag 1 vs. Tag 5; $p < 0,0001$

Tag 3 vs. Tag 5; $p < 0,0001$

Diese Werte sprechen für einen hoch signifikanten Anstieg der Zellzahl zwischen Tag 1 und 3 sowie für einen hoch signifikanten Abfall der Zellzahl von Tag 1 auf Tag 5 sowie von Tag 3 auf Tag 5.

3.4.2.8. Titan, allgemein

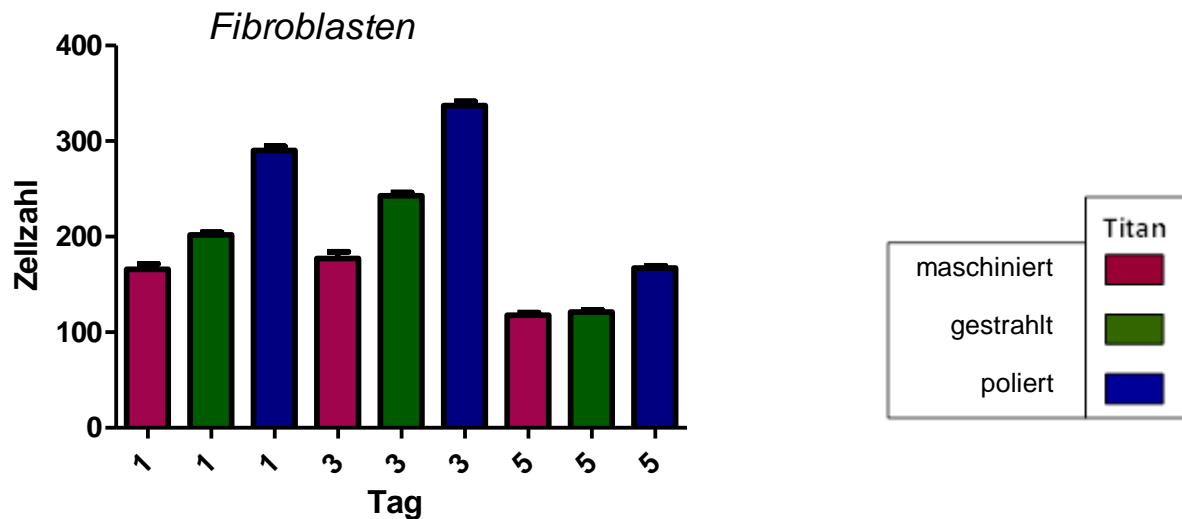


Abbildung 17: Übersicht über die Fibroblastenanzahl auf den verschiedenen Titanoberflächen an allen Messtagen.

Auf allen Oberflächen kam es von Tag 3 auf Tag 5 zu einem Abfall der Zellzahl. Signifikanzen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

HGF1, Titan, Zellzahl		Tag 1			Tag 3			Tag 5		
		masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert
Tag 1	masch.		0,0006	<0,0001				<0,0001		
	gestr.			<0,0001		<0,0001			<0,0001	
	poliert						<0,0001			<0,0001
Tag 3	masch.					<0,0001	<0,0001	<0,0001		
	gestr.						<0,0001		<0,0001	
	poliert									<0,0001
Tag 5	masch.									<0,0001
	gestr.									<0,0001
	poliert									

Tabelle 2: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Zellzahl der Fibroblasten auf Titan.

Gezeigt sind Signifikanzen innerhalb der Gruppen und zwischen den einzelnen Messtagen.

Wie Abbildung 17 zeigt, erhöhte sich auf allen drei Oberflächen die durchschnittliche Zellzahl zunächst und fiel bis Tag 5 auf einen Wert kleiner dem an Tag 1 ab. Auf der polierten Oberfläche war die Zellzahl stets am höchsten, auf der maschinieren dagegen stets am niedrigsten.

Bis auf den direkten Vergleich der maschinieren mit der gestrahlten Oberfläche an Tag 5 (maschinieren vs. gestrahlt: $p = 0,4693$) bestanden an allen Tagen im direkten Vergleich der Oberflächen signifikante Unterschiede. Tag 1: maschinieren vs. gestrahlt: $p = 0,0006$; maschinieren vs. poliert: $p < 0,0001$; gestrahlt vs. poliert: $p < 0,0001$ / Tag 3: maschinieren vs. gestrahlt: $p < 0,0001$; maschinieren vs. poliert: $p < 0,0001$; gestrahlt vs. poliert: $p < 0,0001$ / Tag 5: maschinieren vs. poliert: $p < 0,0001$; gestrahlt vs. poliert: $p < 0,0001$.

3.4.3. Epithelzellen

Bei den Epithelzellen waren auf beiden Werkstoffen und allen Oberflächen an Tag 5 keine Zellen mehr vorhanden.

3.4.3.1. ZrO_2 , maschinieren

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 185,8 Zellen $\pm 16,1$ auf der maschinieren Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 218,7 Zellen ± 11 . An Tag 5 fanden sich überhaupt keine Zellen mehr auf der Zylinderoberfläche. Man erhält einen p-Wert $< 0,0001$. Dies steht für eine deutliche Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergab sich folgendes Ergebnis:

Tag 1 vs. Tag 3; $p < 0,0001$

Dieser Wert steht für einen hoch signifikanten Anstieg der Zellzahl zwischen Tag 1 und 3.

3.4.3.2. ZrO_2 , gestrahlt

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 155,1 Zellen ± 8 auf der gestrahlten Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 183,8 Zellen $\pm 9,4$. An Tag 5 fanden sich überhaupt keine Zellen mehr auf der Zylinderoberfläche. Man erhält einen p-Wert $< 0,0001$. Dies steht für eine deutliche Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergab sich folgendes Ergebnis:

Tag 1 vs. Tag 3; $p < 0,0001$

Dieser Wert steht für einen hoch signifikanten Anstieg der Zellzahl zwischen Tag 1 und 3.

3.4.3.3. ZrO₂, poliert

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 158,8 Zellen +/-10,4 auf der polierten Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 176,1 Zellen +/-8,6. An Tag 5 fanden sich überhaupt keine Zellen mehr auf der Zylinderoberfläche. Man erhält einen p-Wert < 0,0001. Dies steht für eine deutliche Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergab sich folgendes Ergebnis:

Tag 1 vs. Tag 3; p = 0,0011

Dieser Wert steht für einen signifikanten Anstieg der Zellzahl zwischen Tag 1 und 3.

3.4.3.4. ZrO₂, allgemein

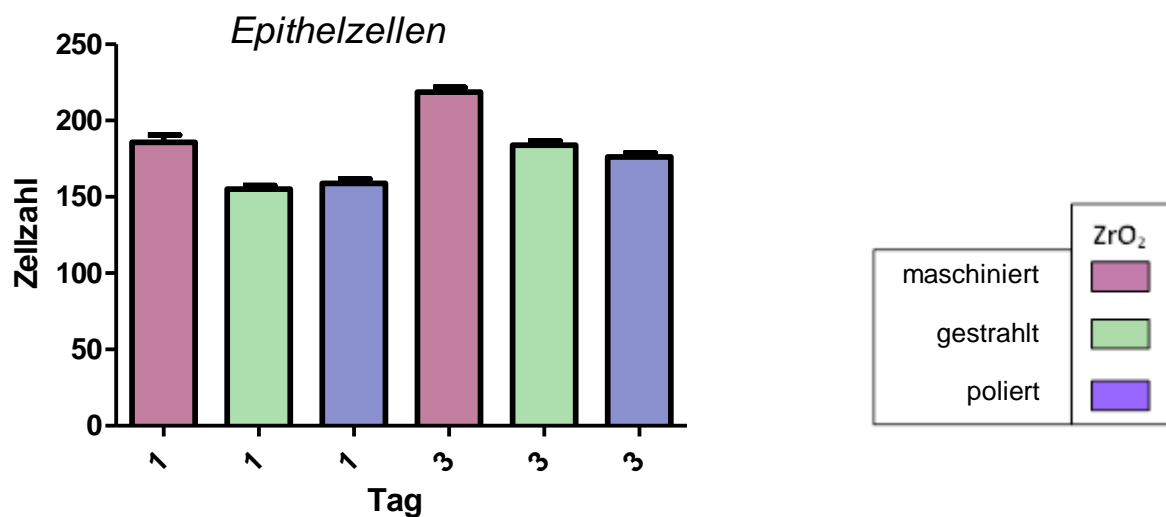


Abbildung 18: Übersicht über die Epithelzellanzahl auf den verschiedenen Zirkoniumdioxidoberflächen an allen Messtagen.

An Tag 5 fanden sich auf allen Oberflächen keine Zellen mehr. Signifikanzen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

HNEpC-c, ZrO ₂ , Zellzahl		Tag 1			Tag 3			Tag 5		
		masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert
Tag 1	masch.		0,0002	0,0008	<0,0001					
	gestr.					<0,0001				
	poliert						0,0011			
Tag 3	masch.					<0,0001	<0,0001			
	gestr.									
	poliert									
Tag 5	masch.									
	gestr.									
	poliert									

Tabelle 3: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Zellzahl der Epithelzellen auf Zirkoniumdioxid.

Gezeigt sind Signifikanzen innerhalb der Gruppen und zwischen den einzelnen Messtagen.

Wie Abbildung 18 zeigt, erhöhte sich auf allen drei Oberflächen die durchschnittliche Zellzahl zunächst und fiel dann bis Tag 5 auf null ab. Auf der maschinieren Oberfläche war die Zellzahl stets am höchsten.

Bis auf den direkten Vergleich der gestrahlten mit der polierten Oberfläche an Tag 1 und Tag 3 (Tag 1 gestrahlt vs. poliert: $p = 0,5829$; Tag 3 gestrahlt vs. poliert: $p = 0,0687$) bestanden an allen Tagen im direkten Vergleich der Oberflächen signifikante Unterschiede. Tag 1: maschinieren vs. gestrahlt: $p = 0,0002$; maschinieren vs. poliert: $p = 0,0008$ / Tag 3: maschinieren vs. gestrahlt: $p < 0,0001$; maschinieren vs. poliert: $p < 0,0001$.

3.4.3.5. Titan, maschinieren

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 115,1 Zellen $\pm 9,6$ auf der maschinieren Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 151,8 Zellen $\pm 11,7$. An Tag 5 fanden sich überhaupt keine Zellen mehr auf der Zylinderoberfläche. Man erhält einen p -Wert $< 0,0001$. Dies steht für eine deutliche Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergab sich folgendes Ergebnis:

Tag 1 vs. Tag 3; $p < 0,0001$

Dieser Wert steht für einen hoch signifikanten Anstieg der Zellzahl zwischen Tag 1 und 3.

3.4.3.6. Titan, gestrahlt

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 226,6 Zellen ± 9 auf der gestrahlten Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 311,6 Zellen $\pm 13,1$. An Tag 5 fanden sich überhaupt keine Zellen mehr auf der Zylinderoberfläche. Man erhält einen p-Wert $< 0,0001$. Dies steht für eine deutliche Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergab sich folgendes Ergebnis:

Tag 1 vs. Tag 3; $p < 0,0001$

Dieser Wert steht für einen hoch signifikanten Anstieg der Zellzahl zwischen Tag 1 und 3.

3.4.3.7. Titan, poliert

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 100 Zellen $\pm 7,5$ auf der polierten Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 112,8 Zellen $\pm 9,4$. An Tag 5 fanden sich überhaupt keine Zellen mehr auf der Zylinderoberfläche. Man erhält einen p-Wert $< 0,0001$. Dies steht für eine deutliche Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergab sich folgendes Ergebnis:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,0029$

Dieser Wert steht für einen signifikanten Anstieg der Zellzahl zwischen Tag 1 und 3.

3.4.3.8. Titan, allgemein

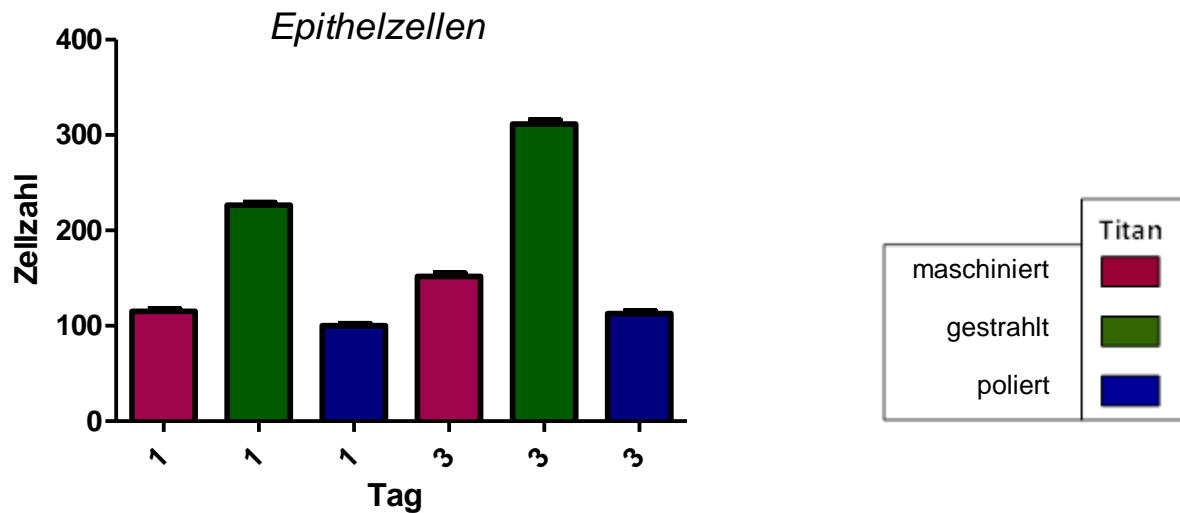


Abbildung 19: Übersicht über die Epithelzellanzahl auf den verschiedenen Titanoberflächen an allen Messtagen.

An Tag 5 fanden sich auf allen Oberflächen keine Zellen mehr. Signifikanzen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

HNEpC-c, Titan, Zellzahl		Tag 1			Tag 3			Tag 5		
		masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert
Tag 1	masch.		<0,0001	0,0009	<0,0001					
	gestr.			<0,0001		<0,0001				
	poliert						0,0029			
Tag 3	masch.					<0,0001	<0,0001			
	gestr.						<0,0001			
	poliert									
Tag 5	masch.									
	gestr.									
	poliert									

Tabelle 4: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Zellzahl der Epithelzellen auf Titan.

Gezeigt sind Signifikanzen innerhalb der Gruppen und zwischen den einzelnen Messtagen.

Wie Abbildung 19 zeigt, erhöhte sich auf allen drei Oberflächen die durchschnittliche Zellzahl zunächst und fiel dann bis Tag 5 auf null ab. Auf der gestrahlten Oberfläche war die Zellzahl stets am höchsten, auf der polierten Oberfläche war der Wert stets am niedrigsten.

An allen Tagen bestanden im direkten Vergleich der Oberflächen signifikante Unterschiede. Tag 1: maschiniert vs. gestrahlt: $p < 0,0001$; maschiniert vs. poliert: $p = 0,0009$; gestrahlt vs. poliert: $p < 0,0001$ / Tag 3: maschiniert vs. gestrahlt: $p < 0,0001$; maschiniert vs. poliert: $p < 0,0001$; gestrahlt vs. poliert: $p < 0,0001$.

3.5. Anzahl primär nicht anwachsender Zellen

Die Epithelzellen, wie auch die Fibroblasten wurden stets mit einer Konzentration von 1000 Zellen/Deckfläche ausgesät. Von diesen 1000 Zellen wuchsen die meisten jedoch primär erst gar nicht an. Selbst bei idealen Bedingungen wären die Zellen nicht zu 100% angewachsen, da auch die Trypsinierung Stress für die Zelle darstellt und nicht alle Zellen diese Prozedur überleben. Primär wuchsen die meisten Fibroblasten auf dem maschinieren Titan an. Bei den Epithelzellen fand sich auf dem gestrahlten Titan die höchste Anzahl primär anwachsender Zellen. Der höchste Zellverlust fand sich dagegen bei den Fibroblasten auf der maschinieren Titanoberfläche und bei den Epithelzellen auf der polierten Titanoberfläche. Über verschiedene Vorversuche ermittelte ich die Ausgangskonzentration von 1000 Zellen/Deckfläche. Werden nämlich zu wenige Zellen ausgesät, so wachsen diese erst gar nicht auf der Deckfläche an.

Zelltyp	Werkstoff	Oberfläche	Tag	Anzahl angewachsener Zellen		Anzahl nicht angewachsener Zellen	
				abs.	%	abs.	%
HGF	ZrO2	maschiniert	1	258,6	25,9%	741,4	74,1%
HGF	ZrO2	gestrahlt	1	326,8	32,7%	673,2	67,3%
HGF	ZrO2	poliert	1	275	27,5%	725	72,5%
HGF	Titan	maschiniert	1	165,7	16,6%	834,3	83,4%
HGF	Titan	gestrahlt	1	201,9	20,2%	798,1	79,8%
HGF	Titan	poliert	1	290,3	29,0%	709,7	71,0%
HNEpC-c	ZrO2	maschiniert	1	185,8	18,6%	814,2	81,4%
HNEpC-c	ZrO2	gestrahlt	1	155,1	15,5%	844,9	84,5%
HNEpC-c	ZrO2	poliert	1	158,8	15,9%	841,2	84,1%
HNEpC-c	Titan	maschiniert	1	115,1	11,5%	884,9	88,5%
HNEpC-c	Titan	gestrahlt	1	226,6	22,7%	773,4	77,3%
HNEpC-c	Titan	poliert	1	100	10,0%	900	90,0%

Tabelle 5: Übersicht über die Anzahl angewachsener und nicht angewachsener Epithelzellen und Fibroblasten auf allen Werkstoffen und Oberflächen.

3.6. Fläche und Ausläufer

Flächen- und Längenangaben sind in μm^2 bzw. μm . Bei den Statistiken bezüglich der Länge der Ausläufer wurden nur die Zellen mit einbezogen, die auch tatsächlich Ausläufer hatten.

3.6.1. Fibroblasten

3.6.1.1. ZrO_2 , gestrahlt

An Tag 1 wiesen die Zellen auf der gestrahlten Oberfläche durchschnittlich eine Fläche von $2339,2 \mu\text{m}^2 \pm 1882$ auf. An Tag 3 betrug der durchschnittliche Wert $1844,7 \mu\text{m}^2 \pm 956$. Die Fläche der Zellen fiel zum Tag 5 auf einen durchschnittlichen Wert von $1779,8 \mu\text{m}^2 \pm 864$. Man erhält einen p-Wert von 0,7902. Dies ist nicht signifikant. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,62$

Tag 1 vs. Tag 5; $p = 0,50$

Tag 3 vs. Tag 5; $p = 0,93$

Diese Werte bestätigen, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen vorliegen.

Von insgesamt 31 untersuchten Zellen hatten an Tag 1 auf der gestrahlten Oberfläche 7 Zellen keine Ausläufer, 6 hatten einen Ausläufer, 17 hatten zwei Ausläufer und 1 Zelle hatte drei Ausläufer. Am zweiten Messtag (Tag 3) hatten von 36 Zellen 15 keinen Ausläufer, 7 einen Ausläufer, 14 zwei Ausläufer und keine Zelle drei Ausläufer. Am letzten Messtag (Tag 5) hatten von insgesamt 33 Zellen 7 keinen Ausläufer, 10 einen Ausläufer, 16 zwei Ausläufer und keine Zelle drei Ausläufer. An Tag 1 hatten die Ausläufer eine durchschnittliche Länge von $18,35 \mu\text{m} \pm 6$, an Tag 3 lag dieser Wert bei $23,36 \mu\text{m} \pm 17$ und an Tag 5 bei $22,04 \mu\text{m} \pm 8$. Man erhält einen p-Wert von 0,0667. Dies spricht für keine Signifikanz. Beim Einzelvergleich mittels ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,0882$

Tag 1 vs. Tag 5; $p = 0,0283$

Tag 3 vs. Tag 5; $p = 0,8982$

Diese Werte bestätigen, dass zwischen den Werten von Tag 1 und 3 sowie zwischen Tag 3 und 5 keine Signifikanzen vorliegen. Dagegen gibt es eine Signifikanz zwischen Tag 1 und 5.

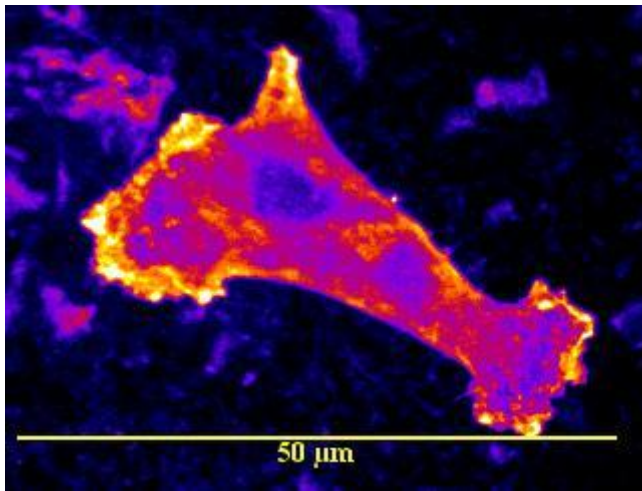


Abbildung 20: Konfokale Fluoreszenzaufnahme eines Fibroblasten auf der gestrahlten Zirkoniumdioxidoberfläche.

Je nach Messtag variiert die durchschnittliche Fläche zwischen $2339,2 \mu\text{m}^2 \pm 1882$ und $1779,8 \mu\text{m}^2 \pm 864$.

3.6.1.2. ZrO_2 , maschinert

An Tag 1 wiesen die Zellen auf der maschinerten Oberfläche durchschnittlich eine Fläche von $2893,2 \mu\text{m}^2 \pm 1697$ auf. An Tag 3 betrug der durchschnittliche Wert $2864,7 \mu\text{m}^2 \pm 1939$. Die Fläche der Zellen fiel zum Tag 5 auf einen durchschnittlichen Wert von $1747,2 \mu\text{m}^2 \pm 787$. Man erhält einen p-Wert von 0,0115. Dies spricht für das Vorliegen einer Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,7827$

Tag 1 vs. Tag 5; $p = 0,0097$

Tag 3 vs. Tag 5; $p = 0,0111$

Diese Werte bestätigen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen Tag 1 und Tag 3 vorliegt. Dagegen finden sich signifikante Unterschiede zwischen den Tagen 1 und 5 sowie zwischen den Tagen 3 und 5.

Von insgesamt 32 untersuchten Zellen hatten an Tag 1 auf der maschinerten Oberfläche 11 Zellen keine Ausläufer, 3 hatten einen Ausläufer, 14 hatten zwei Ausläufer und 4 Zellen hatten drei Ausläufer. Am zweiten Messtag (Tag 3) hatten von 34 Zellen 5 keinen Ausläufer, 10 einen Ausläufer, 18 zwei Ausläufer und 1 Zelle drei Ausläufer. Am letzten Messtag (Tag 5) hatten von insgesamt 34 Zellen 13 keinen Ausläufer, 10 einen Ausläufer, 11 zwei Ausläufer und keine Zelle drei Ausläufer. An Tag 1 hatten die Ausläufer eine durchschnittliche Länge von $18,31 \mu\text{m} \pm 8$, an Tag 3

lag dieser Wert bei $22,17 \mu\text{m} \pm 10$ und an Tag 5 bei $25,52 \mu\text{m} \pm 8$. Man erhält einen p-Wert von 0,0011. Dies spricht für das Vorliegen einer Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,0683$

Tag 1 vs. Tag 5; $p = 0,0002$

Tag 3 vs. Tag 5; $p = 0,0533$

Diese Werte bestätigen, dass zwischen den Werten von Tag 1 und 3 sowie zwischen Tag 3 und 5 keine Signifikanz vorliegt. Dagegen gibt es eine Signifikanz zwischen Tag 1 und 5.

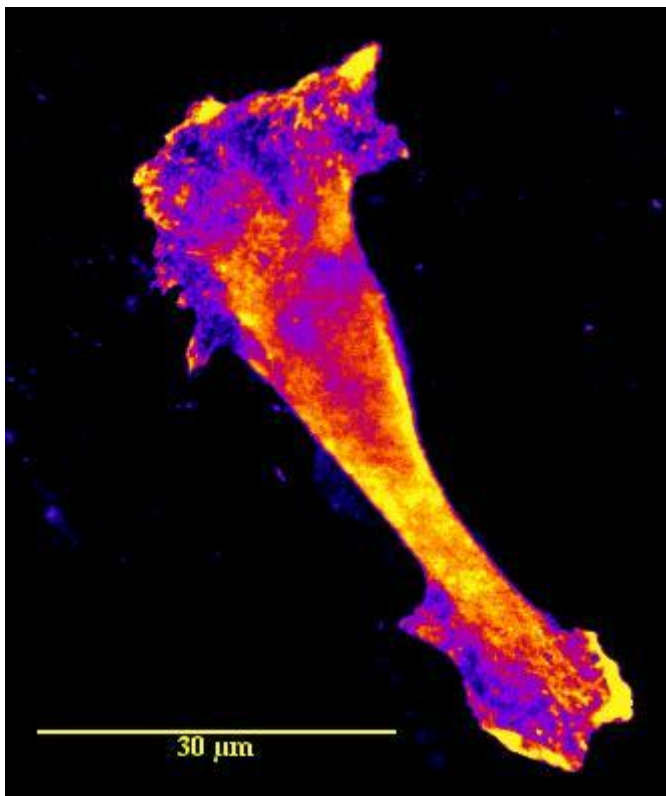


Abbildung 21: Konfokale Fluoreszenzaufnahme eines Fibroblasten auf der maschinerten Zirkoniumdioxidoberfläche.

Je nach Messtag variiert die durchschnittliche Fläche zwischen $2893,2 \mu\text{m}^2 \pm 1697$ und $1747,2 \mu\text{m}^2 \pm 787$.

3.6.1.3. ZrO_2 , poliert

An Tag 1 wiesen die Zellen auf der polierten Oberfläche durchschnittlich eine Fläche von $3535,3 \mu\text{m}^2 \pm 1705$ auf. An Tag 3 betrug der durchschnittliche Wert $3745 \mu\text{m}^2 \pm 1780$. Die Fläche der Zellen fiel zum Tag 5 auf einen durchschnittlichen Wert von

3089,7 μm^2 \pm 1513. Man erhält einen p-Wert von 0,2576. Dies spricht für keine Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; p = 0,8150

Tag 1 vs. Tag 5; p = 0,2004

Tag 3 vs. Tag 5; p = 0,1301

Diese Werte bestätigen, dass keine Signifikanzen zwischen allen Gruppen vorliegen. Von insgesamt 31 untersuchten Zellen hatten an Tag 1 auf der polierten Oberfläche 10 Zellen keine Ausläufer, 6 hatten einen Ausläufer, 13 hatten zwei Ausläufer und 2 Zellen hatten drei Ausläufer. Am zweiten Messtag (Tag 3) hatten von 37 Zellen 14 keinen Ausläufer, 6 einen Ausläufer, 16 zwei Ausläufer und 1 Zelle drei Ausläufer. Am letzten Messtag (Tag 5) hatten von insgesamt 34 Zellen 10 keinen Ausläufer, 9 einen Ausläufer, 13 zwei Ausläufer und 2 Zellen drei Ausläufer. An Tag 1 hatten die Ausläufer eine durchschnittliche Länge von 26,19 μm \pm 10, an Tag 3 lag dieser Wert bei 25,87 μm \pm 10 und an Tag 5 bei 23,46 μm \pm 11. Man erhält einen p-Wert von 0,4201. Dies spricht für keine Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; p = 0,8887

Tag 1 vs. Tag 5; p = 0,2379

Tag 3 vs. Tag 5; p = 0,2882

Diese Werte bestätigen, dass zwischen den Gruppen keine Signifikanzen vorliegen.

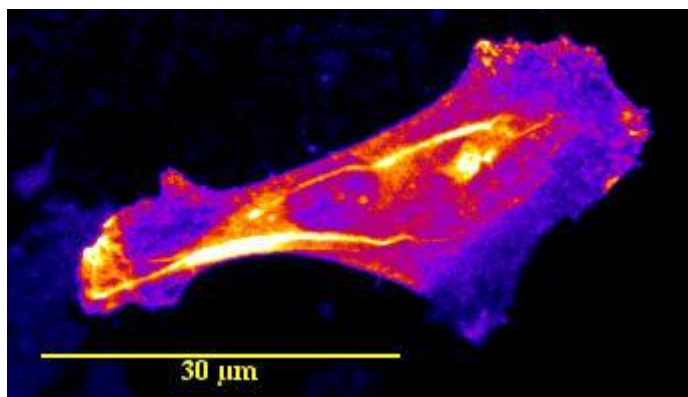


Abbildung 22: Konfokale Fluoreszenzaufnahme eines Fibroblasten auf der polierten Zirkoniumdioxidoberfläche.

Je nach Messtag variiert die durchschnittliche Fläche zwischen 3745 μm^2 \pm 1780 und 3089,7 μm^2 \pm 1513.

3.6.1.4. ZrO₂, gesamt

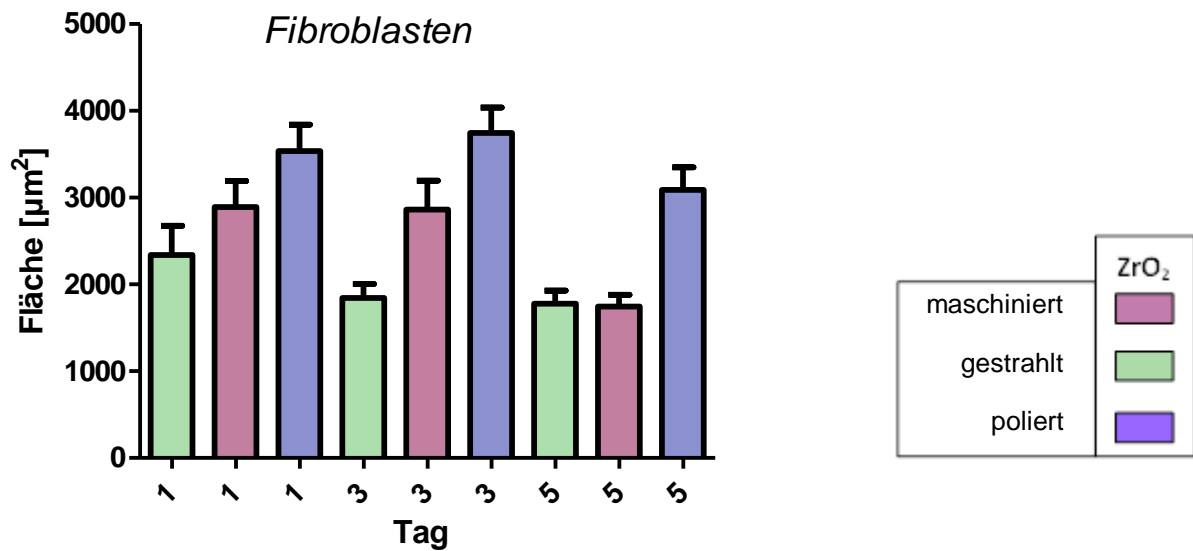


Abbildung 23: Übersicht über die Fläche der Fibroblasten auf den verschiedenen Zirkoniumdioxidoberflächen an allen Messtagen.

An Tag 5 war die Fläche der Fibroblasten auf allen Oberflächen am kleinsten. Signifikanzen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

HGF1, ZrO ₂ , Fläche		Tag 1			Tag 3			Tag 5		
		masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert
Tag 1	masch.							0,0097		
	gestr.			<0,0001						
	poliert									
Tag 3	masch.					0,0284	0,0180	0,0111		
	gestr.						<0,0001			
	poliert									
Tag 5	masch.									<0,0001
	gestr.									0,0002
	poliert									

Tabelle 6: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Fläche der Fibroblasten auf Zirkoniumdioxid.

Gezeigt sind Signifikanzen innerhalb der Gruppen und zwischen den einzelnen Messtagen.

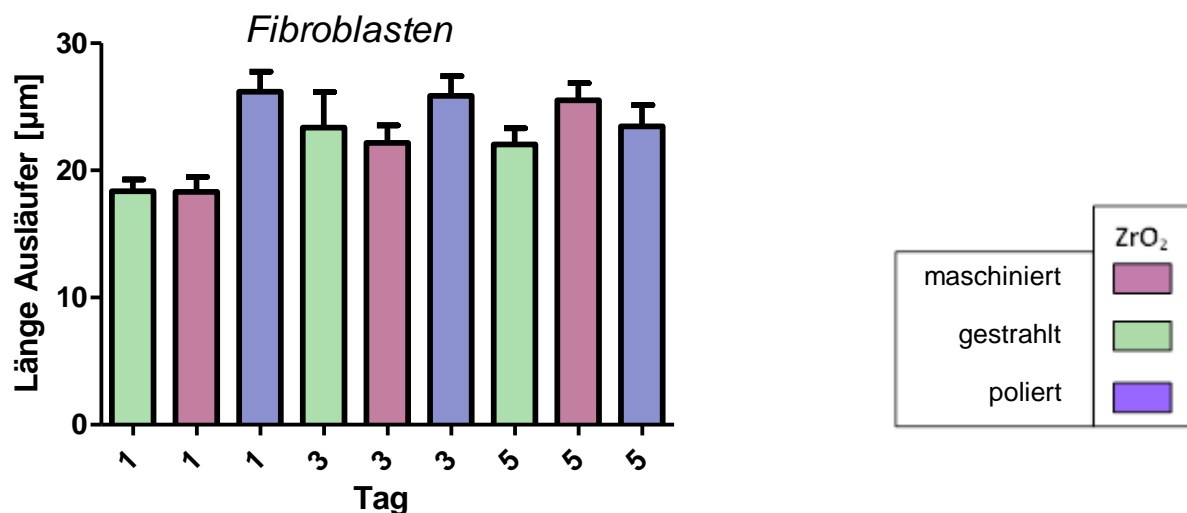


Abbildung 24: Übersicht über die Länge der Fibroblastenausläufer auf den verschiedenen Zirkoniumdioxidoberflächen an allen Messtagen.
Signifikanzen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

HGF1, ZrO ₂ , Ausläufer		Tag 1			Tag 3			Tag 5		
		masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert
Tag 1	masch.			0,0003				0,0002		
	gestr.			0,0002					0,0283	
	poliert									
Tag 3	masch.									
	gestr.									
	poliert									
Tag 5	masch.								0,0435	
	gestr.									
	poliert									

Tabelle 7: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Länge der Fibroblastenausläufer auf Zirkoniumdioxid.

Gezeigt sind Signifikanzen innerhalb der Gruppen und zwischen den einzelnen Messtagen.

Wie Abbildung 23 zeigt, war auf der polierten Oberfläche die Fläche der Fibroblasten an allen 3 Tagen am größten. Sowohl bei der gestrahlten, als auch bei der maschinieren Oberfläche nahm die Fläche von Tag 1 über Tag 3 bis hin zu Tag 5 ab. Auf der polierten Oberfläche nahm die Fläche von Tag 1 zu Tag 3 hin erst leicht zu und fiel zu Tag 5 hin sogar unter den Wert von Tag 1.

Bezüglich der Fläche der Zellen bestanden bis auf den direkten Vergleich der gestrahlten mit der maschinieren Oberfläche an Tag 1 und Tag 5 (Tag 1 gestrahlt vs. maschinieren: $p = 0,0882$ / Tag 5 gestrahlt vs. maschinieren: $p = 0,9052$) und der maschinieren mit der polierten Oberfläche an Tag 1 (maschinieren vs. poliert: $p = 0,1432$) an allen Tagen im direkten Vergleich der Oberflächen signifikante Unterschiede. Tag 1: gestrahlt vs. poliert: $p < 0,0001$ / Tag 3: maschinieren vs. gestrahlt: $p = 0,0284$; maschinieren vs. poliert: $p = 0,0180$; gestrahlt vs. poliert: $p < 0,0001$ / Tag 5: maschinieren vs. poliert: $p < 0,0001$; gestrahlt vs. poliert: $p = 0,0002$. Abbildung 24 zeigt, dass die Länge der Ausläufer auf der gestrahlten Oberfläche von Tag 1 auf Tag 3 zunahm, um dann an Tag 5 wieder abzufallen. Auf der maschinieren Oberfläche nahm die Länge der Ausläufer, im Gegensatz zur polierten Oberfläche, an jedem Messtag zu. Auf der polierten nahm sie an jedem Messtag ab. Betrachtet man den direkten Vergleich der Längen der Ausläufer, so liegt an Tag 1 zwischen der maschinieren und gestrahlten Oberfläche (maschinieren vs. gestrahlt: $p = 0,7956$), an Tag 3 zwischen keiner der Oberflächen (maschinieren vs. gestrahlt: $p = 0,9964$; maschinieren vs. poliert: $p = 0,0573$; gestrahlt vs. poliert: $p = 0,0507$) und an Tag 5 zwischen der maschinieren und der polierten sowie der gestrahlten und der polierten Oberfläche (maschinieren vs. poliert: $p = 0,2924$; gestrahlt vs. poliert: $p = 0,6070$) keine Signifikanz vor. Signifikanzen findet man bei den folgenden Bedingungen. Tag 1: maschinieren vs. poliert: $p = 0,0003$; gestrahlt vs. poliert: $p = 0,0002$ / Tag 5 maschinieren vs. gestrahlt: $p = 0,0435$.

3.6.1.5. Titan, gestrahlt

An Tag 1 wiesen die Zellen auf der gestrahlten Oberfläche durchschnittlich eine Fläche von $874,4 \mu\text{m}^2 \pm 611$ auf. An Tag 3 betrug der durchschnittliche Wert $1120,6 \mu\text{m}^2 \pm 558$. Die Fläche der Zellen fiel zum Tag 5 auf einen durchschnittlichen Wert von $1102,6 \mu\text{m}^2 \pm 500$. Man erhält einen p-Wert von 0,0042. Dies spricht für das Vorliegen einer Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,0043$

Tag 1 vs. Tag 5; $p = 0,0048$

Tag 3 vs. Tag 5; $p = 0,9403$

Diese Werte bestätigen, dass zwischen Tag 1 und 3 sowie zwischen Tag 1 und 5 eine deutliche Signifikanz vorliegt. Dagegen findet sich zwischen Tag 3 und Tag 5 kein signifikanter Unterschied.

Von insgesamt 38 untersuchten Zellen hatten an Tag 1 auf der gestrahlten Oberfläche 26 Zellen keine Ausläufer, 5 hatten einen Ausläufer, 7 hatten zwei Ausläufer und keine Zelle hatte drei Ausläufer. Am zweiten Messtag (Tag 3) hatten von 33 Zellen 22 keinen Ausläufer, 7 einen Ausläufer, 3 zwei Ausläufer und 1 Zelle drei Ausläufer. Am letzten Messtag (Tag 5) hatten von insgesamt 38 Zellen 20 keinen Ausläufer, 9 einen Ausläufer, 9 zwei Ausläufer und 0 Zellen drei Ausläufer. An Tag 1 hatten die Ausläufer eine durchschnittliche Länge von $22,16 \mu\text{m} \pm 15$, an Tag 3 lag dieser Wert bei $19,68 \mu\text{m} \pm 8$ und an Tag 5 bei $18,01 \mu\text{m} \pm 8$. Man erhält einen p-Wert von 0,6442. Dies spricht für keine Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,8296$

Tag 1 vs. Tag 5; $p = 0,4415$

Tag 3 vs. Tag 5; $p = 0,4510$

Diese Werte bestätigen, dass zwischen den Gruppen keine Signifikanzen vorliegen.

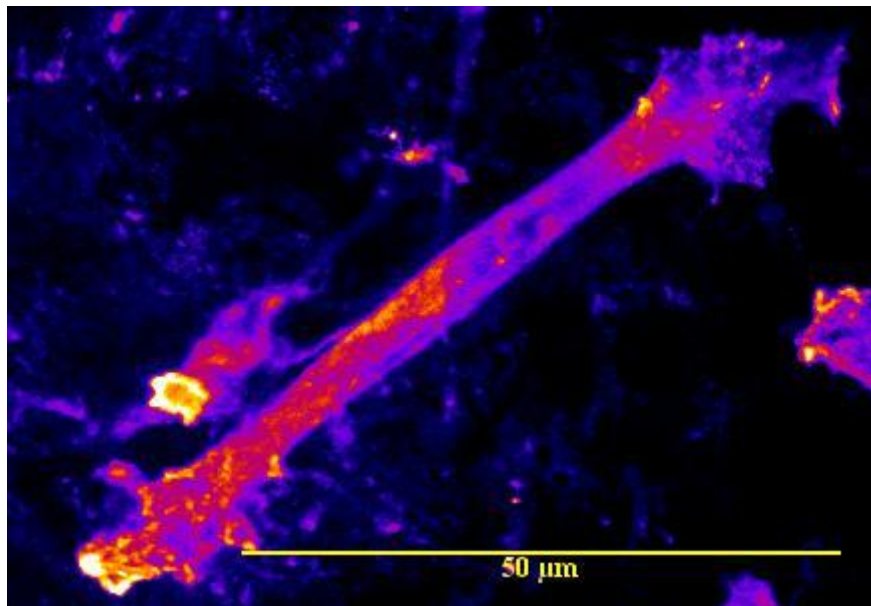


Abbildung 25: Konfokale Fluoreszenzaufnahmen eines Fibroblasten auf der gestrahlten Titanoberfläche. Je nach Messtag variiert die durchschnittliche Fläche zwischen $1120,6 \mu\text{m}^2 \pm 558$ und $874,4 \mu\text{m}^2 \pm 611$.

3.6.1.6. Titan, maschinert

An Tag 1 wiesen die Zellen auf der maschinerten Oberfläche durchschnittlich eine Fläche von $3466,8 \mu\text{m}^2 \pm 1923$ auf. An Tag 3 betrug der durchschnittliche Wert

3729,3 μm^2 \pm 2365. Die Fläche der Zellen fiel zum Tag 5 auf einen durchschnittlichen Wert von 2928,7 μm^2 \pm 1446. Man erhält einen p-Wert von 0,4254. Dies spricht für keine Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; p = 0,9117

Tag 1 vs. Tag 5; p = 0,2812

Tag 3 vs. Tag 5; p = 0,2510

Diese Werte bestätigen, dass zwischen allen Gruppen keine Signifikanzen vorliegen. Von insgesamt 30 untersuchten Zellen hatten an Tag 1 auf der maschinerten Oberfläche 12 Zellen keine Ausläufer, 13 hatten einen Ausläufer, 5 hatten zwei Ausläufer und keine Zelle hatte drei Ausläufer. Am zweiten Messtag (Tag 3) hatten von 30 Zellen 7 keinen Ausläufer, 9 einen Ausläufer, 10 zwei Ausläufer und 4 Zellen drei Ausläufer. Am letzten Messtag (Tag 5) hatten von insgesamt 32 Zellen 13 keinen Ausläufer, 4 einen Ausläufer, 14 zwei Ausläufer und 1 Zelle drei Ausläufer. An Tag 1 hatten die Ausläufer eine durchschnittliche Länge von 23,63 μm \pm 13, an Tag 3 lag dieser Wert bei 21,12 μm \pm 9 und an Tag 5 bei 20,29 μm \pm 8. Man erhält einen p-Wert von 0,6198. Dies spricht für keine Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; p = 0,5018

Tag 1 vs. Tag 5; p = 0,4221

Tag 3 vs. Tag 5; p = 0,5318

Diese Werte bestätigen, dass zwischen den Gruppen keine Signifikanzen vorliegen.

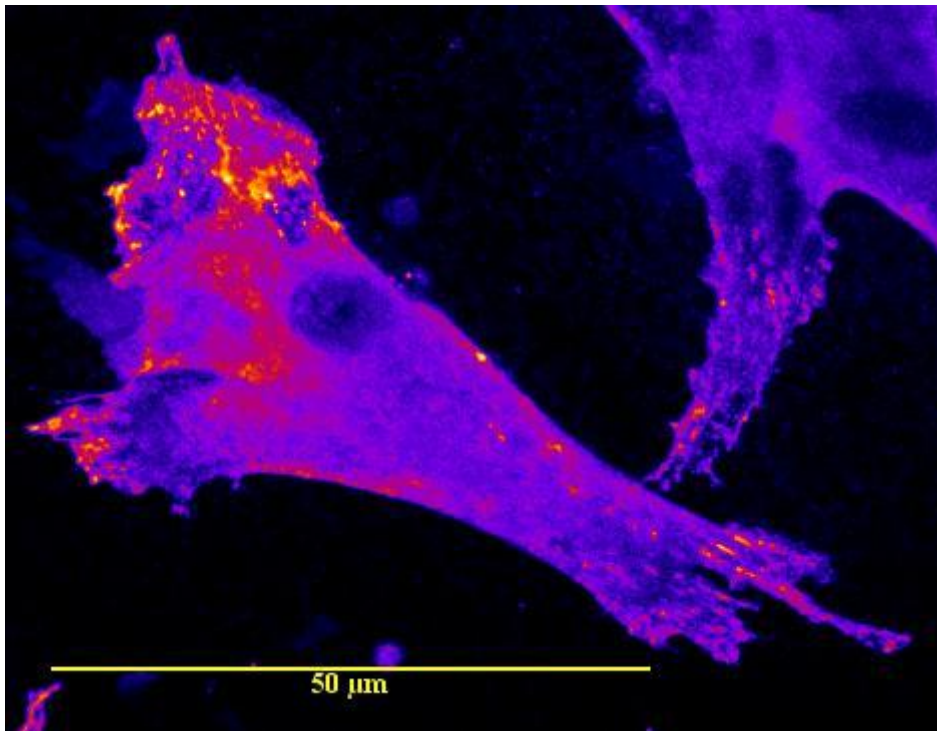


Abbildung 26: Konfokale Fluoreszenzaufnahme eines Fibroblasten auf der maschinieren Titanoberfläche. Je nach Messtag variiert die durchschnittliche Fläche zwischen $3729,3 \mu\text{m}^2 \pm 2365$ und $2928,7 \mu\text{m}^2 \pm 1446$.

3.6.1.7. Titan, poliert

An Tag 1 wiesen die Zellen auf der polierten Oberfläche durchschnittlich eine Fläche von $3676,1 \mu\text{m}^2 \pm 2038$ auf. An Tag 3 betrug der durchschnittliche Wert $5309,5 \mu\text{m}^2 \pm 3502$. Die Fläche der Zellen fiel zum Tag 5 auf einen durchschnittlichen Wert von $3029,4 \mu\text{m}^2 \pm 1779$. Man erhält einen p-Wert von 0,0032. Dies steht für eine Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,0537$

Tag 1 vs. Tag 5; $p = 0,0909$

Tag 3 vs. Tag 5; $p = 0,0013$

Diese Werte bestätigen, dass zwischen Tag 1 und Tag 3 sowie zwischen Tag 1 und Tag 5 keine Signifikanzen vorliegen. Dagegen zeigt sich ein signifikantes Verhalten zwischen Tag 3 und Tag 5.

Von insgesamt 30 untersuchten Zellen hatten an Tag 1 auf der polierten Oberfläche 15 Zellen keine Ausläufer, 8 hatten einen Ausläufer, 5 hatten zwei Ausläufer und 2 Zellen hatten drei Ausläufer. Am zweiten Messtag (Tag 3) hatten von 30 Zellen 10 keinen Ausläufer, 11 einen Ausläufer, 7 zwei Ausläufer und 2 Zellen drei Ausläufer. Am letzten Messtag (Tag 5) hatten von insgesamt 35 Zellen 7 keinen Ausläufer, 11

einen Ausläufer, 17 zwei Ausläufer und keine Zelle drei Ausläufer. An Tag 1 hatten die Ausläufer eine durchschnittliche Länge von $15,53 \mu\text{m} \pm 5$, an Tag 3 lag dieser Wert bei $21,17 \mu\text{m} \pm 9$ und an Tag 5 bei $22,06 \mu\text{m} \pm 10$. Man erhält einen p-Wert von 0,0109. Dies spricht für Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,0123$

Tag 1 vs. Tag 5; $p = 0,0050$

Tag 3 vs. Tag 5; $p = 0,8079$

Diese Werte bestätigen, dass zwischen Tag 1 und Tag 3 sowie zwischen Tag 1 und Tag 5 signifikante Unterschiede vorliegen. Dagegen liegt keine Signifikanz zwischen Tag 3 und Tag 5 vor.

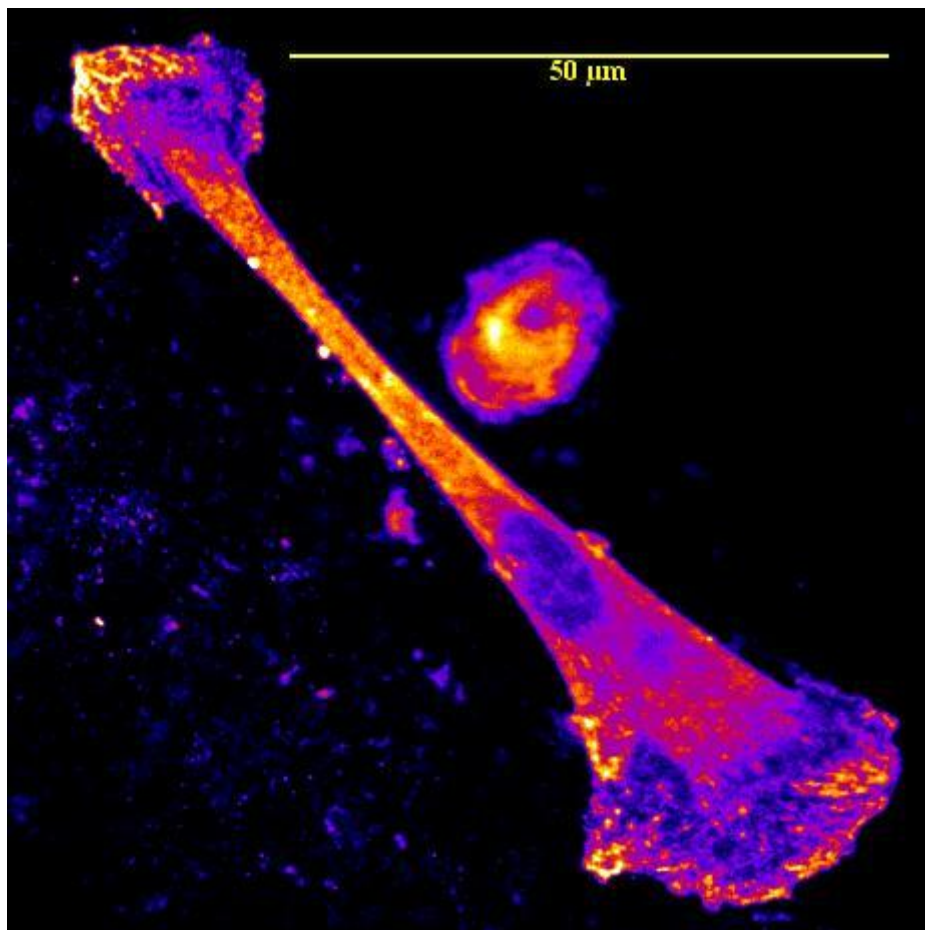


Abbildung 27: Konfokale Fluoreszenzaufnahme eines Fibroblasten auf der polierten Titanoberfläche. Je nach Messtag variiert die durchschnittliche Fläche zwischen $5309,5 \mu\text{m}^2 \pm 3502$ und $3029,4 \mu\text{m}^2 \pm 1779$.

3.6.1.8. Titan, gesamt

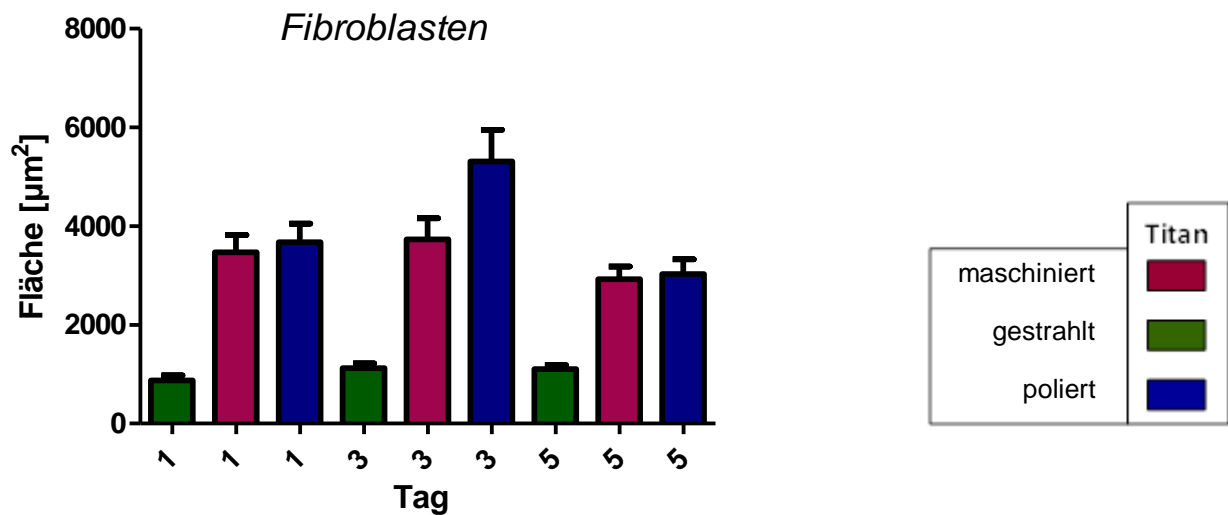


Abbildung 28: Übersicht über die Fläche der Fibroblasten auf den verschiedenen Titanoberflächen an allen Messtagen.

Signifikanzen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

HGF1, Titan, Fläche		Tag 1			Tag 3			Tag 5		
		masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert
Tag 1	masch.		<0,0001							
	gestr.			<0,0001		0,0043			0,0048	
	poliert									
Tag 3	masch.					<0,0001	0,0303			
	gestr.						<0,0001			
	poliert									0,0013
Tag 5	masch.								<0,0001	
	gestr.									<0,0001
	poliert									

Tabelle 8: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Fläche der Fibroblasten auf Titan.

Gezeigt sind Signifikanzen innerhalb der Gruppen und zwischen den einzelnen Messtagen.

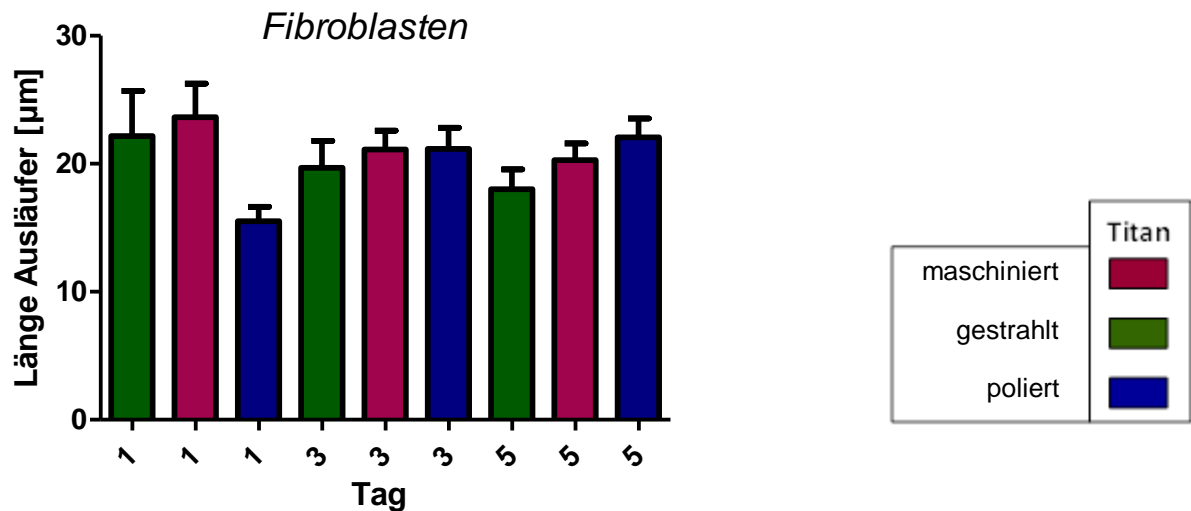


Abbildung 29: Übersicht über die Länge der Fibroblastenausläufer auf den verschiedenen Titanoberflächen an allen Messtagen.

Signifikanzen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

HGF1, Titan, Ausläufer		Tag 1			Tag 3			Tag 5		
		masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert
Tag 1	masch.			0,0182						
	gestr.									
	poliert						0,0123			0,0050
Tag 3	masch.									
	gestr.									
	poliert									
Tag 5	masch.									
	gestr.									
	poliert									

Tabelle 9: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Länge der Fibroblastenausläufer auf Titan.

Gezeigt sind Signifikanzen innerhalb der Gruppen und zwischen den einzelnen Messtagen.

Wie Abbildung 28 zeigt, stieg auf allen 3 Oberflächen die Fläche der Zellen von Tag 1 auf Tag 3 erst an und fiel dann von Tag 3 auf Tag 5 hin wieder ab. Auf der maschinieren und polierten Oberfläche fiel der Wert sogar unter den Wert von Tag 1. Auf der gestrahlten Oberfläche sank der Wert zu Tag 5 zwar auch, aber er lag noch über dem Wert von Tag 1.

Bezüglich der Fläche der Zellen bestanden bis auf den direkten Vergleich der maschinieren mit der polierten Oberfläche an Tag 1 und Tag 5 (Tag 1 maschinieren vs. poliert: $p = 0,5692$ / Tag 5 maschinieren vs. poliert: $p = 0,9250$) an allen Tagen im direkten Vergleich der Oberflächen signifikante Unterschiede. Tag 1: maschinieren vs. gestrahlt: $p < 0,0001$; gestrahlt vs. poliert: $p < 0,0001$ / Tag 3: maschinieren vs. gestrahlt: $p < 0,0001$; maschinieren vs. poliert: $p = 0,0303$; gestrahlt vs. poliert: $p < 0,0001$ / Tag 5: maschinieren vs. gestrahlt: $p < 0,0001$; gestrahlt vs. poliert: $p < 0,0001$).

Abbildung 29 zeigt, dass die Länge der Ausläufer auf der gestrahlten und maschinieren Oberfläche von Tag 1 zu Tag 3 und Tag 5 abnahm. Auf der polierten Oberfläche ist dagegen eine ständige Längenzunahme zu beobachten.

Betrachtet man den direkten Vergleich der Längen der Ausläufer, so liegt an Tag 1 zwischen der maschinieren und gestrahlten Oberfläche (maschinieren vs. gestrahlt: $p = 0,5358$) und der gestrahlten und der polierten (gestrahlt vs. poliert: $p = 0,1326$) keine Signifikanz vor. Ebenfalls liegt an Tag 3 (maschinieren vs. gestrahlt: $p = 0,6507$; maschinieren vs. poliert: $p = 0,7502$; gestrahlt vs. poliert: $p = 0,7027$) sowie an Tag 5 zwischen keiner der Oberflächen (maschinieren vs. gestrahlt: $p = 0,1774$; maschinieren vs. poliert: $p = 0,6140$; gestrahlt vs. poliert: $p = 0,0895$) eine Signifikanz vor. An Tag 1 findet sich zwischen der maschinieren und der polierten Oberfläche eine Signifikanz (maschinieren vs. poliert: $p = 0,0182$).

3.6.2. Epithelzellen

3.6.2.1. ZrO_2 , gestrahlt

An Tag 1 wiesen die Zellen auf der gestrahlten Oberfläche durchschnittlich eine Fläche von $1089 \mu\text{m}^2 \pm 312$ auf. An Tag 3 betrug der durchschnittliche Wert $1266,6 \mu\text{m}^2 \pm 442$. An Tag 5 befanden sich keine Zellen mehr auf den Zylindern. Man erhält einen p -Wert $< 0,0001$. Dies steht für eine hohe Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergab sich folgendes Ergebnis:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,0325$

Dieser Wert bestätigt, dass zwischen Tag 1 und Tag 3 ein signifikantes Verhalten vorliegt.

Von insgesamt 38 untersuchten Zellen hatten an Tag 1 auf der gestrahlten Oberfläche 36 Zellen keine Ausläufer, 2 hatten einen Ausläufer, 0 hatten zwei Ausläufer und 0 Zellen hatten drei Ausläufer. Am zweiten Messtag (Tag 3) hatten von 33 Zellen 16 keinen Ausläufer, 12 einen Ausläufer, 5 zwei Ausläufer und 0 Zellen drei Ausläufer. Am letzten Messtag (Tag 5) hatten von insgesamt 37 Zellen 17 keinen Ausläufer, 15 einen Ausläufer, 6 zwei Ausläufer und keine Zelle drei Ausläufer. An Tag 1 hatten die Ausläufer eine durchschnittliche Länge von $34,63 \mu\text{m} \pm 31$, an Tag 3 lag dieser Wert bei $19,10 \mu\text{m} \pm 6$. Man erhält einen p-Wert von 0,0023. Dies spricht für Signifikanz.

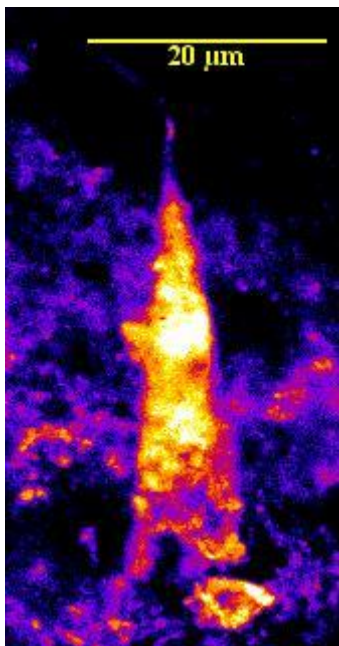


Abbildung 30: Konfokale Fluoreszenzaufnahme einer Epithelzelle auf der gestrahlten Zirkoniumdioxidoberfläche.

Je nach Messtag variiert die durchschnittliche Fläche zwischen $1266,6 \mu\text{m}^2 \pm 442$ und $1089 \mu\text{m}^2 \pm 312$.

3.6.2.2. ZrO_2 , maschinert

An Tag 1 wiesen die Zellen auf der maschinerten Oberfläche durchschnittlich eine Fläche von $1884,4 \mu\text{m}^2 \pm 860$ auf. An Tag 3 betrug der durchschnittliche Wert $2297,8 \mu\text{m}^2 \pm 1644$. An Tag 5 fanden sich keine Zellen mehr auf den Zylindern. Man erhält einen p-Wert $< 0,0001$. Dies spricht für eine hohe Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergab sich folgendes Ergebnis:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,6085$

Dieser Wert sagt aus, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen vorliegt.

Von insgesamt 38 untersuchten Zellen hatten an Tag 1 auf der maschinieren Oberfläche 17 Zellen keine Ausläufer, 15 hatten einen Ausläufer, 6 hatten zwei Ausläufer und 0 Zellen hatten drei Ausläufer. Am zweiten Messtag (Tag 3) hatten von 34 Zellen 13 keinen Ausläufer, 8 einen Ausläufer, 13 zwei Ausläufer und keine Zelle drei Ausläufer. An Tag 1 hatten die Ausläufer eine durchschnittliche Länge von $18,68 \mu\text{m} \pm 7$, an Tag 3 lag dieser Wert bei $17,68 \mu\text{m} \pm 8$. Man erhält einen p-Wert von 0,0007. Dies spricht für eine hohe Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergab sich folgendes Ergebnis:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,2638$

Dieser Wert sagt aus, dass zwischen Tag 1 und 3 keine Signifikanz vorliegt.

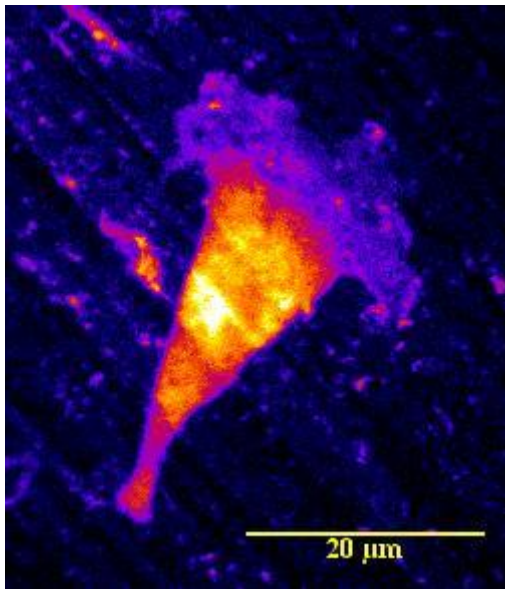


Abbildung 31: Konfokale Fluoreszenzaufnahme einer Epithelzelle auf der maschinieren Zirkoniumdioxidoberfläche.

Je nach Messtag variiert die durchschnittliche Fläche zwischen $2297,8 \mu\text{m}^2 \pm 1644$ und $1884,4 \mu\text{m}^2 \pm 860$.

3.6.2.3. ZrO_2 , poliert

An Tag 1 wiesen die Zellen auf der polierten Oberfläche durchschnittlich eine Fläche von $1356 \mu\text{m}^2 \pm 876$ auf. An Tag 3 betrug der durchschnittliche Wert $1466,6 \mu\text{m}^2 \pm 826$. An Tag 5 fanden sich keine Zellen mehr auf den Zylindern. Man erhält einen p-

Wert $< 0,0001$. Dies spricht für eine hohe Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergab sich folgendes Ergebnis:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,3693$

Dieser Wert sagt aus, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen vorliegt.

Von insgesamt 34 untersuchten Zellen hatten an Tag 1 auf der polierten Oberfläche 11 Zellen keine Ausläufer, 14 hatten einen Ausläufer, 8 hatten zwei Ausläufer und 0 Zellen hatten drei Ausläufer. Am zweiten Messtag (Tag 3) hatten von 33 Zellen 13 keinen Ausläufer, 5 einen Ausläufer, 14 zwei Ausläufer und 1 Zelle drei Ausläufer. An Tag 1 hatten die Ausläufer eine durchschnittliche Länge von $15,98 \mu\text{m} \pm 7$, an Tag 3 lag dieser Wert bei $16,65 \mu\text{m} \pm 9$. Man erhält einen p-Wert von 0,0012. Dies spricht für eine Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergab sich folgendes Ergebnis:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,9927$

Dieser Wert sagt aus, dass zwischen Tag 1 und 3 keine Signifikanz vorliegt.

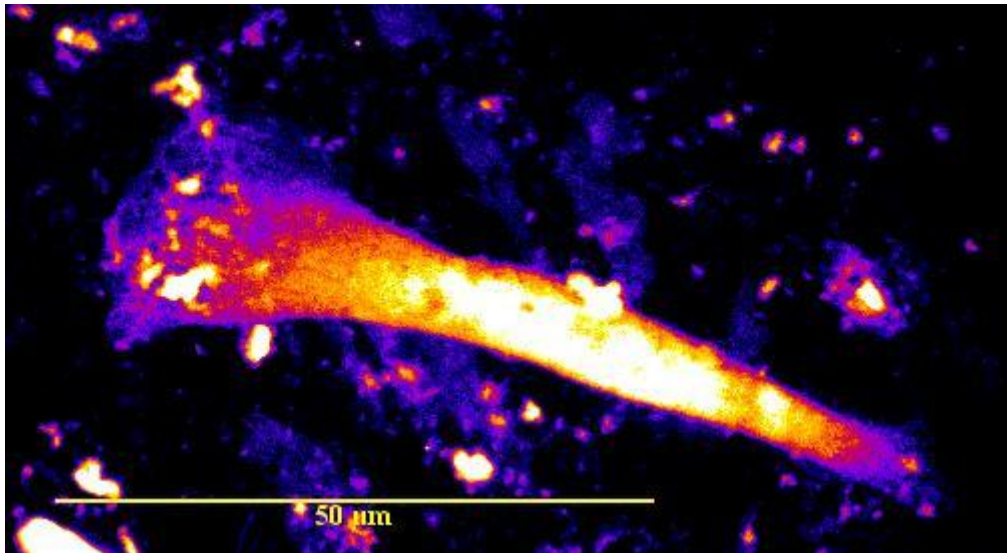


Abbildung 32: Konfokale Fluoreszenzaufnahme einer Epithelzelle auf der polierten Zirkoniumdioxidoberfläche.

Je nach Messtag variiert die durchschnittliche Fläche zwischen $1466,6 \mu\text{m}^2 \pm 826$ und $1356 \mu\text{m}^2 \pm 876$.

3.6.2.4. ZrO₂, gesamt

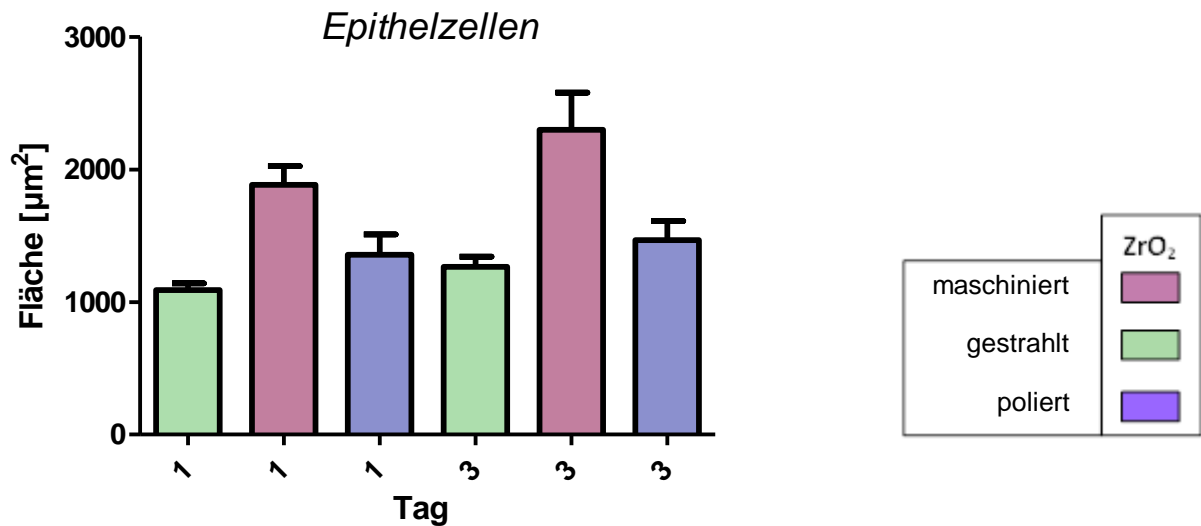


Abbildung 33: Übersicht über die Fläche der Epithelzellen auf den verschiedenen Zirkoniumdioxidoberflächen an allen Messtagen.

An Tag 5 fanden sich keine Epithelzellen. Signifikanzen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

HNEpC-c, ZrO ₂ , Fläche		Tag 1			Tag 3			Tag 5		
		masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert
Tag 1	masch.		<0,0001	0,0031						
	gestr.					0,0325				
	poliert									
Tag 3	masch.					0,0023	0,0315			
	gestr.									
	poliert									
Tag 5	masch.									
	gestr.									
	poliert									

Tabelle 10: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Fläche der Epithelzellen auf Zirkoniumdioxid.

Gezeigt sind Signifikanzen innerhalb der Gruppen und zwischen den einzelnen Messtagen.

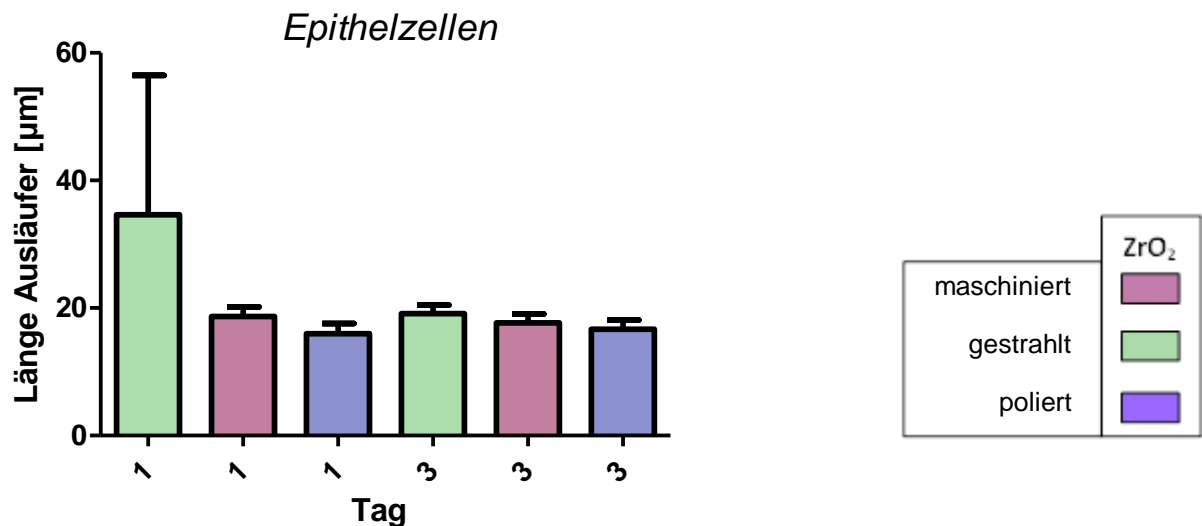


Abbildung 34: Übersicht über die Länge der Epithelzellausläufer auf den verschiedenen Zirkoniumdioxidoberflächen an allen Messtagen.

An Tag 5 fanden sich auf allen Oberflächen keine Zellen mehr. Signifikanzen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

HNEpC-c, ZrO ₂ , Ausläufer		Tag 1			Tag 3			Tag 5		
		masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert
Tag 1	masch.									
	gestr.									
	poliert									
Tag 3	masch.									
	gestr.						0,0387			
	poliert									
Tag 5	masch.									
	gestr.									
	poliert									

Tabelle 11: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Epithelzellausläufer auf Zirkoniumdioxid.

Gezeigt sind Signifikanzen innerhalb der Gruppen und zwischen den einzelnen Messtagen.

Wie Abbildung 33 zeigt, zeigten alle Oberflächen in Bezug auf die Fläche ein gleiches Verhalten. Von Tag 1 auf Tag 3 nahm die Fläche jeweils zu. Allerdings wiesen die Zellen auf der gestrahlten Oberfläche immer die kleinste und die Zellen auf der maschinieren Oberfläche immer die größte Fläche auf.

Bezüglich der Fläche der Zellen bestanden bis auf den direkten Vergleich der gestrahlten mit der polierten Oberfläche an Tag 1 und Tag 3 (Tag 1 gestrahlt vs. poliert: $p = 0,7425$ / Tag 3 gestrahlt vs. poliert: $p = 0,5813$) an allen Tagen im direkten Vergleich der Oberflächen signifikante Unterschiede. Tag 1: maschinert vs. gestrahlt: $p < 0,0001$; maschinert vs. poliert: $p = 0,0031$ / Tag 3: maschinert vs. gestrahlt: $p = 0,0023$; maschinert vs. poliert: $p = 0,0315$.

Abbildung 34 zeigt, dass die Länge der Ausläufer von Tag 1 auf Tag 3 auf der gestrahlten und der maschinerten Oberfläche abnahm. Auf der polierten Oberfläche nahm sie dagegen zu. Die Ausläufer waren auf der gestrahlten Oberfläche immer am längsten.

Betrachtet man den direkten Vergleich der Längen der Ausläufer, so liegen, bis auf den direkten Vergleich zwischen der gestrahlten und der polierten Oberfläche an Tag 3 (Tag 3 gestrahlt vs. poliert: $p = 0,0387$), keine Signifikanzen vor (Tag 1 maschinert vs. gestrahlt: p nicht ermittelbar; maschinert vs. poliert: $p = 0,1468$; gestrahlt vs. poliert: p nicht ermittelbar/ Tag 3 maschinert vs. gestrahlt: $0,2646$; maschinert vs. poliert: $p = 0,2065$).

3.6.2.5. Titan, gestrahlt

An Tag 1 wiesen die Zellen auf der gestrahlten Oberfläche durchschnittlich eine Fläche von $1117,3 \mu\text{m}^2 \pm 471$ auf. An Tag 3 betrug der durchschnittliche Wert $1696,2 \mu\text{m}^2 \pm 869$. An Tag 5 fanden sich keine Zellen mehr auf den Zylindern. Man erhält einen p -Wert $< 0,0001$. Dies spricht für eine hohe Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergab sich folgendes Ergebnis:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,0009$

Dieser Wert bestätigt, dass eine hohe Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen vorliegt.

Von insgesamt 39 untersuchten Zellen hatten an Tag 1 auf der gestrahlten Oberfläche 35 Zellen keine Ausläufer, 3 hatten einen Ausläufer, 1 hatte zwei Ausläufer und 0 Zellen hatten drei Ausläufer. Am zweiten Messtag (Tag 3) hatten von 30 Zellen 10 keinen Ausläufer, 14 einen Ausläufer, 6 zwei Ausläufer und keine Zelle drei Ausläufer. An Tag 1 hatten die Ausläufer eine durchschnittliche Länge von $24,10 \mu\text{m} \pm 11$, an Tag 3 lag dieser Wert bei $25,6 \mu\text{m} \pm 9$. Man erhält einen p -Wert von $0,0007$. Dies spricht für eine hohe Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergab sich folgendes Ergebnis:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,9757$

Dieser Wert sagt aus, dass zwischen Tag 1 und 3 keine Signifikanz vorliegt.

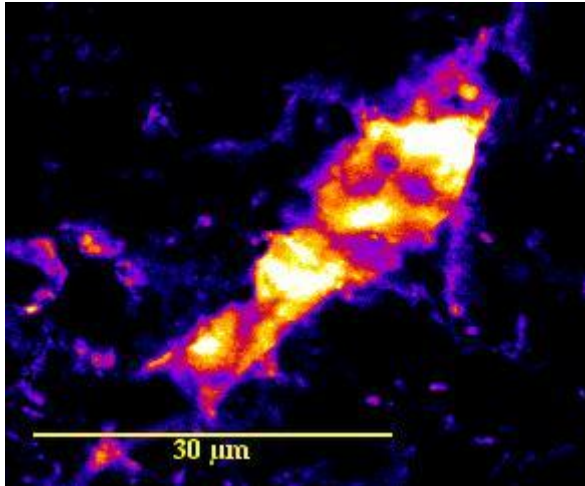


Abbildung 35: Konfokale Fluoreszenzaufnahme einer Epithelzelle auf der gestrahlten Titanoberfläche. Je nach Messtag variiert die durchschnittliche Fläche zwischen $1696,2 \mu\text{m}^2 \pm 869$ und $1117,3 \mu\text{m}^2 \pm 471$.

3.6.2.6. Titan, maschinert

An Tag 1 wiesen die Zellen auf der maschinerten Oberfläche durchschnittlich eine Fläche von $2471 \mu\text{m}^2 \pm 1120$ auf. An Tag 3 betrug der durchschnittliche Wert $2844,1 \mu\text{m}^2 \pm 1561$. An Tag 5 fanden sich keine Zellen mehr auf den Zylindern. Man erhält einen p -Wert $< 0,0001$. Dies spricht für eine hohe Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergab sich folgendes Ergebnis:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,5276$

Dieser Wert besagt, dass keine Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen vorliegt.

Von insgesamt 37 untersuchten Zellen hatten an Tag 1 auf der gestrahlten Oberfläche 28 Zellen keine Ausläufer, 6 hatten einen Ausläufer, 2 hatte zwei Ausläufer und 1 Zelle hatte drei Ausläufer. Am zweiten Messtag (Tag 3) hatten von 32 Zellen 6 keinen Ausläufer, 19 einen Ausläufer, 6 zwei Ausläufer und eine Zelle drei Ausläufer. An Tag 1 hatten die Ausläufer eine durchschnittliche Länge von $24 \mu\text{m} \pm 6$, an Tag 3 lag dieser Wert bei $25,82 \mu\text{m} \pm 13$. Man erhält einen p -Wert von $0,0004$. Dies spricht für eine hohe Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergab sich folgendes Ergebnis:

Tag 1 vs. Tag 3; $p = 0,8028$

Dieser Wert sagt aus, dass zwischen Tag 1 und 3 keine Signifikanz vorliegt.

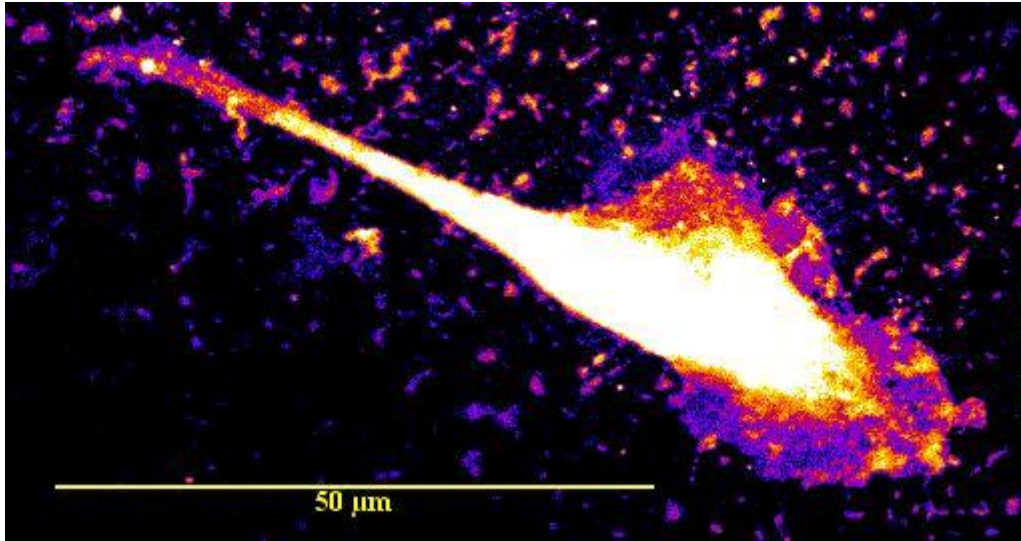


Abbildung 36: Konfokale Fluoreszenzaufnahme einer Epithelzelle auf der maschinieren Titanoberfläche. Je nach Messtag variiert die durchschnittliche Fläche zwischen $2844,1 \mu\text{m}^2 \pm 1561$ und $2471 \mu\text{m}^2 \pm 1120$.

3.6.2.7. Titan, poliert

An Tag 1 wiesen die Zellen auf der polierten Oberfläche durchschnittlich eine Fläche von $2500,2 \mu\text{m}^2 \pm 889$ auf. An Tag 3 betrug der durchschnittliche Wert $6681,6 \mu\text{m}^2 \pm 5079$. An Tag 5 fanden sich keine Zellen mehr auf den Zylindern. Man erhält einen p -Wert $< 0,0001$. Dies spricht für eine hohe Signifikanz. Beim Einzelvergleich ergab sich folgendes Ergebnis:

Tag 1 vs. Tag 3; $p < 0,0001$

Dieser Wert besagt, dass eine hohe Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen vorliegt.

Von insgesamt 39 untersuchten Zellen hatten an Tag 1 auf der polierten Oberfläche 39 Zellen keine Ausläufer, 0 hatten einen Ausläufer, 0 hatten zwei Ausläufer und 0 Zellen hatte drei Ausläufer. Am zweiten Messtag (Tag 3) hatten von 26 Zellen 12 keinen Ausläufer, 7 einen Ausläufer, 6 zwei Ausläufer und 1 Zelle drei Ausläufer. An Tag 1 hatten die Ausläufer eine durchschnittliche Länge von $0 \mu\text{m} \pm 0$, an Tag 3 lag dieser Wert bei $23,22 \mu\text{m} \pm 9$. Man erhält einen p -Wert von $0,0004$. Dies spricht für eine hohe Signifikanz.

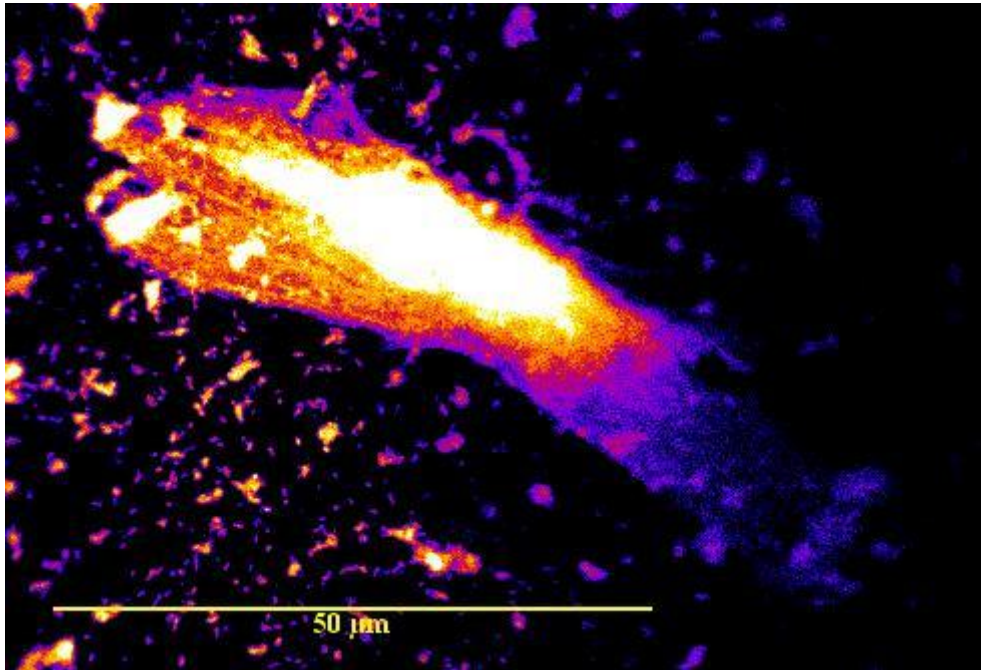


Abbildung 37: Konfokale Fluoreszenzaufnahme einer Epithelzelle auf der polierten Titanoberfläche. Je nach Messtag variiert die durchschnittliche Fläche zwischen $6681,6 \mu\text{m}^2 \pm 5079$ und $2500,2 \mu\text{m}^2 \pm 889$.

3.6.2.8. Titan, gesamt

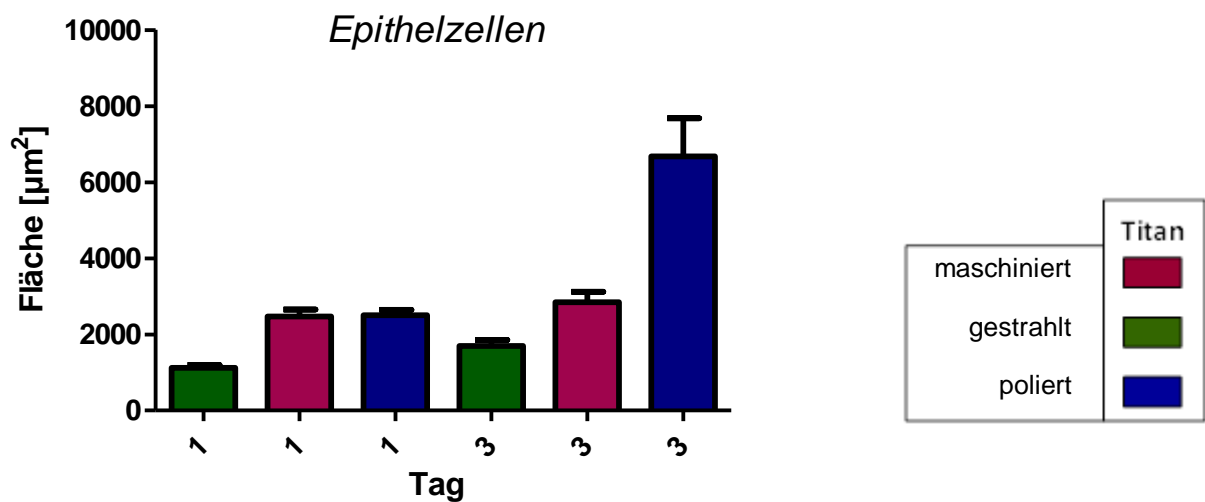


Abbildung 38: Übersicht über die Fläche der Epithelzellen auf den verschiedenen Titanoberflächen an allen Messtagen.

An Tag 5 fanden sich auf allen Oberflächen keine Zellen mehr. Signifikanzen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

HNEpC-c, Titan, Fläche		Tag 1			Tag 3			Tag 5		
		masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert	masch.	gestr.	poliert
Tag 1	masch.		<0,0001							
	gestr.			<0,0001		0,0009				
	poliert						<0,0001			
Tag 3	masch.					0,0006	0,0002			
	gestr.						<0,0001			
	poliert									
Tag 5	masch.									
	gestr.									
	poliert									

Tabelle 12: Darstellung vorhandener signifikanter Unterschiede bezüglich der Fläche der Epithelzellen auf Titan.

Gezeigt sind Signifikanzen innerhalb der Gruppen und zwischen den einzelnen Messtagen.

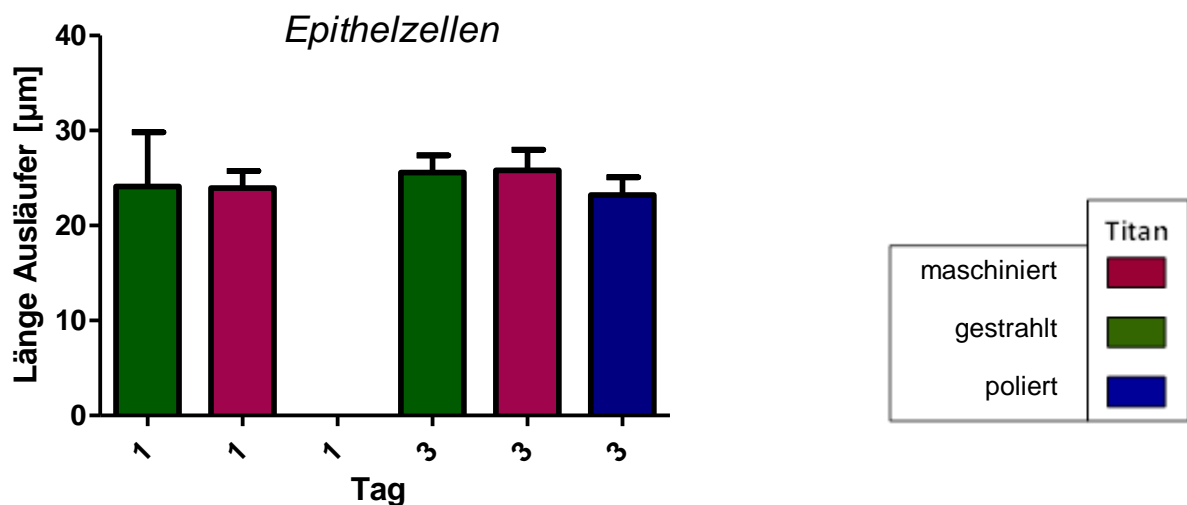


Abbildung 39: Übersicht über die Länge der Epithelzellausläufer auf den verschiedenen Titanoberflächen an allen Messtagen.

An Tag 5 fanden sich auf allen Oberflächen keine Zellen mehr. Im direkten Vergleich zwischen den Oberflächen lagen keine Signifikanzen vor.

Wie Abbildung 38 zeigt, nahm, wie beim Zirkoniumdioxid, die Fläche auf allen 3 Oberflächen von Tag 1 auf Tag 3 zu. Auf der gestrahlten Oberfläche war die Fläche stets am kleinsten.

Bezüglich der Fläche der Zellen bestanden bis auf den direkten Vergleich der maschinerten mit der polierten Oberfläche an Tag 1 (maschinert vs. poliert: $p = 0,6625$) an allen Tagen im direkten Vergleich der Oberflächen signifikante Unterschiede. Tag 1: maschinert vs. gestrahlt: $p < 0,0001$; gestrahlt vs. poliert: $p <$

0,0001/ Tag 3: maschinert vs. gestrahlt: $p = 0,0006$; maschinert vs. poliert: $p = 0,0002$; gestrahlt vs. poliert: $p < 0,001$.

Abbildung 39 zeigt, dass auch die Länge der Ausläufer auf allen Oberflächen von Tag 1 zu Tag 3 zunahm.

Betrachtet man den direkten Vergleich der Längen der Ausläufer, so liegen keine Signifikanzen vor (Tag 1 maschinert vs. gestrahlt: $p = 0,8651$; maschinert vs. poliert: p nicht ermittelbar; gestrahlt vs. poliert: p nicht ermittelbar/ Tag 3 maschinert vs. gestrahlt: $p = 0,9346$; maschinert vs. poliert: $p = 0,5293$; gestrahlt vs. poliert: $p = 0,4626$).

3.7. Direkter Vergleich zwischen Titan und ZrO_2

3.7.1. Zellzahl

3.7.1.1. Fibroblasten

3.7.1.1.1. Polierte Oberfläche

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 290,3 Zellen $\pm 15,2$ auf der polierten Titanoberfläche und 275 $\pm 9,7$ auf der ZrO_2 -Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 337,1 Zellen $\pm 14,8$ auf der Titanoberfläche und 364,5 $\pm 15,5$ auf der ZrO_2 -Oberfläche. Die Anzahl der Zellen fiel zum Tag 5 auf der Titanoberfläche auf einen Wert von 167,3 $\pm 7,8$ Zellen und auf der ZrO_2 -Oberfläche auf einen Wert von 320,8 $\pm 25,7$ Zellen.

Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1_{Titan} vs. Tag 1_{ZrO₂}; $p = 0,0059$ (Tag 1_{Titan} > Tag 1_{ZrO₂})

Tag 3_{Titan} vs. Tag 3_{ZrO₂}; $p = 0,0005$ (Tag 3_{Titan} < Tag 3_{ZrO₂})

Tag 5_{Titan} vs. Tag 5_{ZrO₂}; $p < 0,0001$ (Tag 5_{Titan} < Tag 5_{ZrO₂})

Diese Werte stehen für einen signifikanten Unterschied der Zellzahl an Tag 1 sowie für einen signifikanten Unterschied der Zellzahl an Tag 3 und einen hoch signifikanten Unterschied der Zellzahl an Tag 5.

3.7.1.1.2. Maschinerte Oberfläche

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 165,7 Zellen $\pm 20,1$ auf der maschinerten Titanoberfläche und 258,6 $\pm 12,2$ auf der ZrO_2 -Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 177,3 Zellen $\pm 24,1$ auf der Titanoberfläche und 284,9 ± 37 auf der ZrO_2 -Oberfläche. Die Anzahl der Zellen fiel zum Tag 5 auf der Titanoberfläche auf einen Wert von 117,9 $\pm 9,2$ Zellen und auf der ZrO_2 -Oberfläche auf einen Wert von 129,2 $\pm 8,6$ Zellen.

Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1_{Titan} vs. Tag 1_{ZrO₂}; $p = 0,0022$ (Tag 1_{Titan} < Tag 1_{ZrO₂})

Tag 3_{Titan} vs. Tag 3_{ZrO₂}; $p < 0,0001$ (Tag 3_{Titan} < Tag 3_{ZrO₂})

Tag 5_{Titan} vs. Tag 5_{ZrO₂}; $p = 0,0109$ (Tag 5_{Titan} < Tag 5_{ZrO₂})

Diese Werte stehen für einen signifikanten Unterschied der Zellzahl an Tag 1 sowie für einen hoch signifikanten Unterschied der Zellzahl an Tag 3 und einen signifikanten Unterschied der Zellzahl an Tag 5.

3.7.1.1.3. Gestrahlte Oberfläche

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 201,9 Zellen $\pm 8,7$ auf der gestrahlten Titanoberfläche und 326,8 $\pm 12,9$ auf der ZrO_2 -Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 242,9 Zellen $\pm 11,5$ auf der Titanoberfläche und 383,3 ± 21 auf der ZrO_2 -Oberfläche. Die Anzahl der Zellen fiel zum Tag 5 auf der Titanoberfläche auf einen Wert von 121,1 $\pm 2,6$ Zellen und auf der ZrO_2 -Oberfläche auf einen Wert von 204,2 $\pm 31,3$ Zellen.

Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1_{Titan} vs. Tag 1_{ZrO₂}; $p < 0,0001$ (Tag 1_{Titan} < Tag 1_{ZrO₂})

Tag 3_{Titan} vs. Tag 3_{ZrO₂}; $p < 0,0001$ (Tag 3_{Titan} < Tag 3_{ZrO₂})

Tag 5_{Titan} vs. Tag 5_{ZrO₂}; $p < 0,0001$ (Tag 5_{Titan} < Tag 5_{ZrO₂})

Diese Werte stehen für einen hoch signifikanten Unterschied der Zellzahl an Tag 1 sowie für einen hoch signifikanten Unterschied der Zellzahl an Tag 3 und einen hoch signifikanten Unterschied der Zellzahl an Tag 5.

3.7.1.2. Epithelzellen

3.7.1.2.1. Polierte Oberfläche

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 100 Zellen $\pm 7,5$ auf der polierten Titanoberfläche und 158,8 $\pm 10,4$ auf der ZrO_2 -Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 112,8 Zellen $\pm 9,4$ auf der Titanoberfläche und 176,1 $\pm 8,6$ auf der ZrO_2 -Oberfläche.

Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1_{Titan} vs. Tag 1_{ZrO₂}; $p < 0,0001$ (Tag 1_{Titan} < Tag 1_{ZrO₂})

Tag 3_{Titan} vs. Tag 3_{ZrO₂}; $p < 0,0001$ (Tag 3_{Titan} < Tag 3_{ZrO₂})

Diese Werte stehen für einen hoch signifikanten Unterschied der Zellzahl an Tag 1 sowie für einen hoch signifikanten Unterschied der Zellzahl an Tag 3.

3.7.1.2.2. Maschinerte Oberfläche

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 115,1 Zellen $\pm 9,6$ auf der maschinerten Titanoberfläche und 185,8 $\pm 16,1$ auf der ZrO_2 -Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 151,8 Zellen $\pm 11,7$ auf der Titanoberfläche und 218,7 ± 11 auf der ZrO_2 -Oberfläche.

Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1_{Titan} vs. Tag 1_{ZrO₂}; $p < 0,0001$ (Tag 1_{Titan} < Tag 1_{ZrO₂})

Tag 3_{Titan} vs. Tag 3_{ZrO₂}; $p < 0,0001$ (Tag 3_{Titan} < Tag 3_{ZrO₂})

Diese Werte stehen für einen hoch signifikanten Unterschied der Zellzahl an Tag 1 sowie für einen hoch signifikanten Unterschied der Zellzahl an Tag 3.

3.7.1.2.3. Gestrahlte Oberfläche

An Tag 1 befanden sich durchschnittlich 226,6 Zellen ± 9 auf der gestrahlten Titanoberfläche und 155,1 ± 8 auf der ZrO_2 -Oberfläche. An Tag 3 waren es dagegen 311,6 Zellen $\pm 13,1$ auf der Titanoberfläche und 183,8 $\pm 9,4$ auf der ZrO_2 -Oberfläche.

Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1_{Titan} vs. Tag 1_{ZrO₂}; $p < 0,0001$ (Tag 1_{Titan} > Tag 1_{ZrO₂})

Tag 3_{Titan} vs. Tag 3_{ZrO₂}; $p < 0,0001$ (Tag 3_{Titan} > Tag 3_{ZrO₂})

Diese Werte stehen für einen hoch signifikanten Unterschied der Zellzahl an Tag 1 sowie für einen hoch signifikanten Unterschied der Zellzahl an Tag 3.

3.7.2. Fläche

3.7.2.1. Fibroblasten

3.7.2.1.1. Polierte Oberfläche

An Tag 1 wiesen die Zellen auf der polierten Titanoberfläche durchschnittlich eine Fläche von $3676,1 \mu\text{m}^2 \pm 2038$ auf und auf der ZrO_2 -Oberfläche $3535,3 \mu\text{m}^2 \pm 1705$. An Tag 3 betrug der durchschnittliche Wert auf der Titanoberfläche $5309,5 \mu\text{m}^2 \pm 3502$ und auf der ZrO_2 -Oberfläche $3745 \mu\text{m}^2 \pm 1780$. Die Fläche der Zellen fiel zum Tag 5 auf der Titanoberfläche auf einen durchschnittlichen Wert von $3029,4 \mu\text{m}^2 \pm 1779$ und auf der ZrO_2 -Oberfläche auf einen Wert von $3099,7 \mu\text{m}^2 \pm 1513$.

Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1_{Titan} vs. Tag 1_{ZrO₂}; $p = 0,7346$ (Tag 1_{Titan} > Tag 1_{ZrO₂})

Tag 3_{Titan} vs. Tag 3_{ZrO₂}; $p = 0,0430$ (Tag 3_{Titan} > Tag 3_{ZrO₂})

Tag 5_{Titan} vs. Tag 5_{ZrO₂}; $p = 0,6440$ (Tag 5_{Titan} < Tag 5_{ZrO₂})

Diese Werte stehen für keinen signifikanten Unterschied der Zellfläche an Tag 1 sowie für einen signifikanten Unterschied der Zellfläche an Tag 3 und keinen signifikanten Unterschied der Zellfläche an Tag 5.

3.7.2.1.2. Maschinerte Oberfläche

An Tag 1 wiesen die Zellen auf der maschinerten Titanoberfläche durchschnittlich eine Fläche von $3466,8 \mu\text{m}^2 \pm 1923$ auf und auf der ZrO_2 -Oberfläche $2893,2 \mu\text{m}^2 \pm 1697$. An Tag 3 betrug der durchschnittliche Wert auf der Titanoberfläche $3729,3 \mu\text{m}^2 \pm 2365$ und auf der ZrO_2 -Oberfläche $2867,4 \mu\text{m}^2 \pm 1939$. Die Fläche der Zellen fiel zum Tag 5 auf der Titanoberfläche auf einen durchschnittlichen Wert von $2928,7 \mu\text{m}^2 \pm 1446$ und auf der ZrO_2 -Oberfläche auf einen Wert von $1747,2 \mu\text{m}^2 \pm 787$.

Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1_{Titan} vs. Tag 1_{ZrO₂}; $p = 0,2340$ (Tag 1_{Titan} > Tag 1_{ZrO₂})

Tag 3_{Titan} vs. Tag 3_{ZrO₂}; $p = 0,0863$ (Tag 3_{Titan} > Tag 3_{ZrO₂})

Tag 5_{Titan} vs. Tag 5_{ZrO₂}; $p = 0,0004$ (Tag 5_{Titan} > Tag 5_{ZrO₂})

Diese Werte stehen für keinen signifikanten Unterschied der Zellfläche an Tag 1 sowie für keinen signifikanten Unterschied der Zellfläche an Tag 3 und einen hoch signifikanten Unterschied der Zellfläche an Tag 5.

3.7.2.1.3. Gestrahlte Oberfläche

An Tag 1 wiesen die Zellen auf der gestrahlten Titanoberfläche durchschnittlich eine Fläche von $874,4 \mu\text{m}^2 \pm 513$ auf und auf der ZrO_2 -Oberfläche $2339,2 \mu\text{m}^2 \pm 1882$. An Tag 3 betrug der durchschnittliche Wert auf der Titanoberfläche $1120,6 \mu\text{m}^2 \pm 558$ und auf der ZrO_2 -Oberfläche $1844,7 \mu\text{m}^2 \pm 956$. Die Fläche der Zellen fiel zum Tag 5 auf der Titanoberfläche auf einen durchschnittlichen Wert von $1102,6 \mu\text{m}^2 \pm 500$ und auf der ZrO_2 -Oberfläche auf einen Wert von $1779,8 \mu\text{m}^2 \pm 864$.

Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1_{Titan} vs. Tag 1_{ZrO₂}; $p < 0,0001$ (Tag 1_{Titan} < Tag 1_{ZrO₂})

Tag 3_{Titan} vs. Tag 3_{ZrO₂}; $p < 0,0001$ (Tag 3_{Titan} < Tag 3_{ZrO₂})

Tag 5_{Titan} vs. Tag 5_{ZrO₂}; $p = 0,0003$ (Tag 5_{Titan} < Tag 5_{ZrO₂})

Diese Werte stehen für einen hoch signifikanten Unterschied der Zellfläche an Tag 1 sowie für einen hoch signifikanten Unterschied der Zellfläche an Tag 3 und einen hoch signifikanten Unterschied der Zellfläche an Tag 5.

3.7.2.2. Epithelzellen

3.7.2.2.1. Polierte Oberfläche

An Tag 1 wiesen die Zellen auf der polierten Titanoberfläche durchschnittlich eine Fläche von $2500,2 \mu\text{m}^2 \pm 889$ auf und auf der ZrO_2 -Oberfläche $1356 \mu\text{m}^2 \pm 876$. An Tag 3 betrug der durchschnittliche Wert auf der Titanoberfläche $661,6 \mu\text{m}^2 \pm 5079$ und auf der ZrO_2 -Oberfläche $1466,6 \mu\text{m}^2 \pm 826$.

Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1_{Titan} vs. Tag 1_{ZrO₂}; $p < 0,0001$ (Tag 1_{Titan} > Tag 1_{ZrO₂})

Tag 3_{Titan} vs. Tag 3_{ZrO₂}; $p < 0,0001$ (Tag 3_{Titan} < Tag 3_{ZrO₂})

Diese Werte stehen für einen hoch signifikanten Unterschied der Zellfläche an Tag 1 sowie für einen hoch signifikanten Unterschied der Zellfläche an Tag 3.

3.7.2.2.2. Gestrahlte Oberfläche

An Tag 1 wiesen die Zellen auf der gestrahlten Titanoberfläche durchschnittlich eine Fläche von $1117,3 \mu\text{m}^2 \pm 471$ auf und auf der ZrO_2 -Oberfläche $1089 \mu\text{m}^2 \pm 312$. An Tag 3 betrug der durchschnittliche Wert auf der Titanoberfläche $1696,2 \mu\text{m}^2 \pm 869$ und auf der ZrO_2 -Oberfläche $1266,6 \mu\text{m}^2 \pm 442$.

Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1_{Titan} vs. Tag 1_{ZrO₂}; $p = 0,7872$ (Tag 1_{Titan} > Tag 1_{ZrO₂})

Tag 3_{Titan} vs. Tag 3_{ZrO₂}; $p = 0,0111$ (Tag 3_{Titan} > Tag 3_{ZrO₂})

Diese Werte stehen für keinen signifikanten Unterschied der Zellfläche an Tag 1 sowie für einen signifikanten Unterschied der Zellfläche an Tag 3.

3.7.3. Länge der Zellausläufer

3.7.3.1. Fibroblasten

3.7.3.1.1. Polierte Oberfläche

An Tag 1 wiesen die Zellausläufer auf der polierten Titanoberfläche durchschnittlich eine Länge von $15,53 \mu\text{m} \pm 5$ auf und auf der ZrO_2 -Oberfläche $26,19 \mu\text{m} \pm 10$. An Tag 3 betrug die durchschnittliche Länge auf der Titanoberfläche $21,17 \mu\text{m} \pm 9$ und auf der ZrO_2 -Oberfläche $25,87 \mu\text{m} \pm 10$. Die Länge der Zellausläufer betrug an Tag 5 auf der Titanoberfläche durchschnittlich $22,06 \mu\text{m} \pm 10$ und auf der ZrO_2 -Oberfläche $23,46 \mu\text{m} \pm 11$.

Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1_{Titan} vs. Tag 1_{ZrO₂}; $p < 0,0001$ (Tag 1_{Titan} < Tag 1_{ZrO₂})

Tag 3_{Titan} vs. Tag 3_{ZrO₂}; $p = 0,0161$ (Tag 3_{Titan} < Tag 3_{ZrO₂})

Tag 5_{Titan} vs. Tag 5_{ZrO₂}; $p = 0,5131$ (Tag 5_{Titan} < Tag 5_{ZrO₂})

Diese Werte stehen für einen hoch signifikanten Unterschied der Länge der Zellausläufer an Tag 1 sowie für einen signifikanten Unterschied der Ausläuferlängen an Tag 3 und keinen signifikanten Unterschied der Ausläuferlängen an Tag 5.

3.7.3.1.2. Maschinerte Oberfläche

An Tag 1 wiesen die Zellausläufer auf der maschinerten Titanoberfläche durchschnittlich eine Länge von $23,63 \mu\text{m} \pm 13$ auf und auf der ZrO_2 -Oberfläche

18,31 μm \pm 8. An Tag 3 betrug die durchschnittliche Länge auf der Titanoberfläche 21,12 μm \pm 9 und auf der ZrO_2 -Oberfläche 22,17 μm \pm 10. Die Länge der Zellausläufer betrug an Tag 5 auf der Titanoberfläche durchschnittlich 20,29 μm \pm 8 und auf der ZrO_2 -Oberfläche 25,52 μm \pm 8.

Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1_{Titan} vs. Tag 1_{ZrO₂}; $p = 0,1108$ (Tag 1_{Titan} > Tag 1_{ZrO₂})

Tag 3_{Titan} vs. Tag 3_{ZrO₂}; $p = 0,6471$ (Tag 3_{Titan} < Tag 3_{ZrO₂})

Tag 5_{Titan} vs. Tag 5_{ZrO₂}; $p = 0,0015$ (Tag 5_{Titan} < Tag 5_{ZrO₂})

Diese Werte stehen für keinen signifikanten Unterschied der Länge der Zellausläufer an Tag 1 sowie für keinen signifikanten Unterschied der Ausläuferlängen an Tag 3 und einen signifikanten Unterschied der Ausläuferlängen an Tag 5.

3.7.3.1.3. Gestrahlte Oberfläche

An Tag 1 wiesen die Zellausläufer auf der gestrahlten Titanoberfläche durchschnittlich eine Länge von 22,16 μm \pm 15 auf und auf der ZrO_2 -Oberfläche 18,35 μm \pm 6. An Tag 3 betrug die durchschnittliche Länge auf der Titanoberfläche 19,68 μm \pm 8 und auf der ZrO_2 -Oberfläche 23,36 μm \pm 17. Die Länge der Zellausläufer betrug an Tag 5 auf der Titanoberfläche durchschnittlich 18,01 μm \pm 8 und auf der ZrO_2 -Oberfläche 22,04 μm \pm 8.

Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1_{Titan} vs. Tag 1_{ZrO₂}; $p = 0,6690$ (Tag 1_{Titan} > Tag 1_{ZrO₂})

Tag 3_{Titan} vs. Tag 3_{ZrO₂}; $p = 0,4526$ (Tag 3_{Titan} < Tag 3_{ZrO₂})

Tag 5_{Titan} vs. Tag 5_{ZrO₂}; $p = 0,0350$ (Tag 5_{Titan} < Tag 5_{ZrO₂})

Diese Werte stehen für keinen signifikanten Unterschied der Länge der Zellausläufer an Tag 1 sowie für keinen signifikanten Unterschied der Ausläuferlängen an Tag 3 und einen signifikanten Unterschied der Ausläuferlängen an Tag 5.

3.7.3.2. Epithelzellen

3.7.3.2.1. Polierte Oberfläche

An Tag 1 wiesen die Zellausläufer auf der polierten Titanoberfläche durchschnittlich eine Länge von 0 μm \pm 0 auf und auf der ZrO_2 -Oberfläche 15,98 μm \pm 7. An Tag 3

betrug die durchschnittliche Länge auf der Titanoberfläche 23,22 μm +/-9 und auf der ZrO_2 -Oberfläche 16,65 μm +/-9.

Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 3_{Titan} vs. Tag 3_{ZrO₂}; $p = 0,0036$ (Tag 3_{Titan} > Tag 3_{ZrO₂})

Diese Werte stehen für einen signifikanten Unterschied der Länge der Zellausläufer an Tag 3.

3.7.3.2.2. Maschinerte Oberfläche

An Tag 1 wiesen die Zellausläufer auf der maschinerten Titanoberfläche durchschnittlich eine Länge von 24 μm +/-6 auf und auf der ZrO_2 -Oberfläche 18,68 μm +/-7. An Tag 3 betrug die durchschnittliche Länge auf der Titanoberfläche 25,82 μm +/-13 und auf der ZrO_2 -Oberfläche 17,68 μm +/-8.

Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 1_{Titan} vs. Tag 1_{ZrO₂}; $p = 0,0145$ (Tag 1_{Titan} > Tag 1_{ZrO₂})

Tag 3_{Titan} vs. Tag 3_{ZrO₂}; $p = 0,0040$ (Tag 3_{Titan} > Tag 3_{ZrO₂})

Diese Werte stehen für einen signifikanten Unterschied der Länge der Zellausläufer an Tag 1 sowie für einen signifikanten Unterschied der Ausläuferlängen an Tag 3.

3.7.3.2.3. Gestrahlte Oberfläche

An Tag 1 wiesen die Zellausläufer auf der gestrahlten Titanoberfläche durchschnittlich eine Länge von 24,10 μm +/-11 auf und auf der ZrO_2 -Oberfläche 34,63 μm +/-31. An Tag 3 betrug die durchschnittliche Länge auf der Titanoberfläche 25,6 μm +/-9 und auf der ZrO_2 -Oberfläche 19,10 μm +/-6.

Beim Einzelvergleich ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tag 3_{Titan} vs. Tag 3_{ZrO₂}; $p = 0,0119$ (Tag 3_{Titan} > Tag 3_{ZrO₂})

Diese Werte stehen für einen signifikanten Unterschied der Länge der Zellausläufer an Tag 3.

3.8. Vinculin

Die Auswertung der Vinculin-Antikörperfärbung erfolgte mittels eines Scores.

Score I: „Vinculin deutlich am Zellrand sichtbar.“

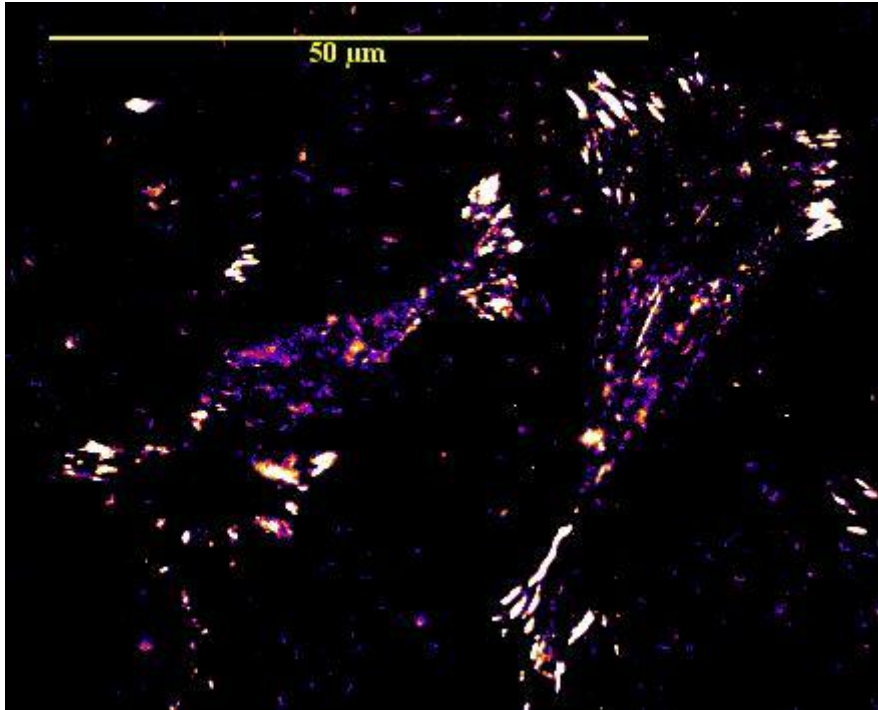


Abbildung 40: Beispiel 1 für Vinculin-Score I.

Es handelt sich um eine konfokale Fluoreszenzaufnahme, bei der das Vinculin deutlich am Zellrand sichtbar ist. Je mehr Vinculin vorhanden, desto heller die Fluoreszenz an diesen Stellen.

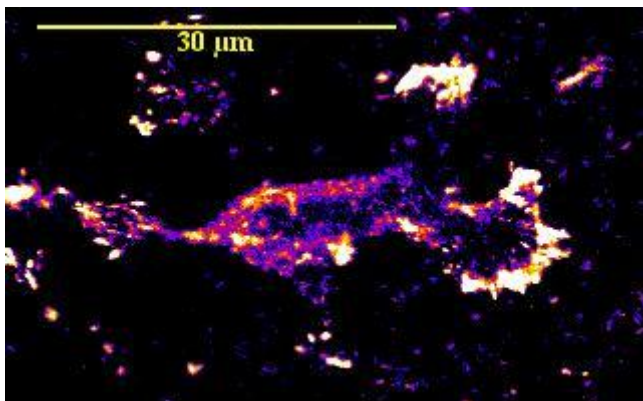


Abbildung 41: Beispiel 2 für Vinculin-Score I.

Es handelt sich um eine konfokale Fluoreszenzaufnahme, bei der das Vinculin deutlich am Zellrand sichtbar ist. Je mehr Vinculin vorhanden, desto heller die Fluoreszenz an diesen Stellen.

Score II: „Vinculin in der ganzen Zelle verteilt.“

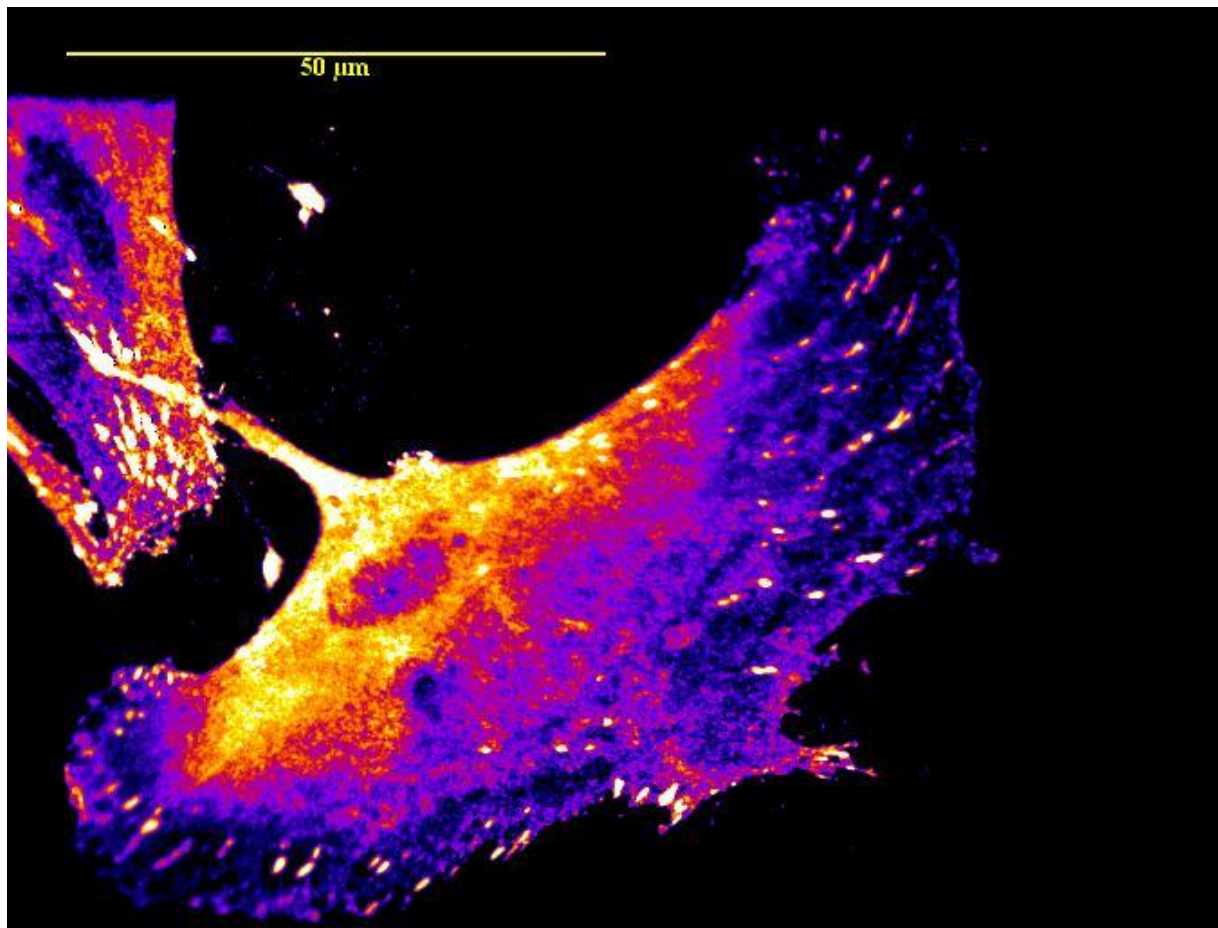


Abbildung 42: Beispiel 1 für Vinculin-Score II.

Es handelt sich um eine konfokale Fluoreszenzaufnahme, bei der das Vinculin in der ganzen Zelle verteilt ist. Je mehr Vinculin vorhanden, desto heller die Fluoreszenz an diesen Stellen.

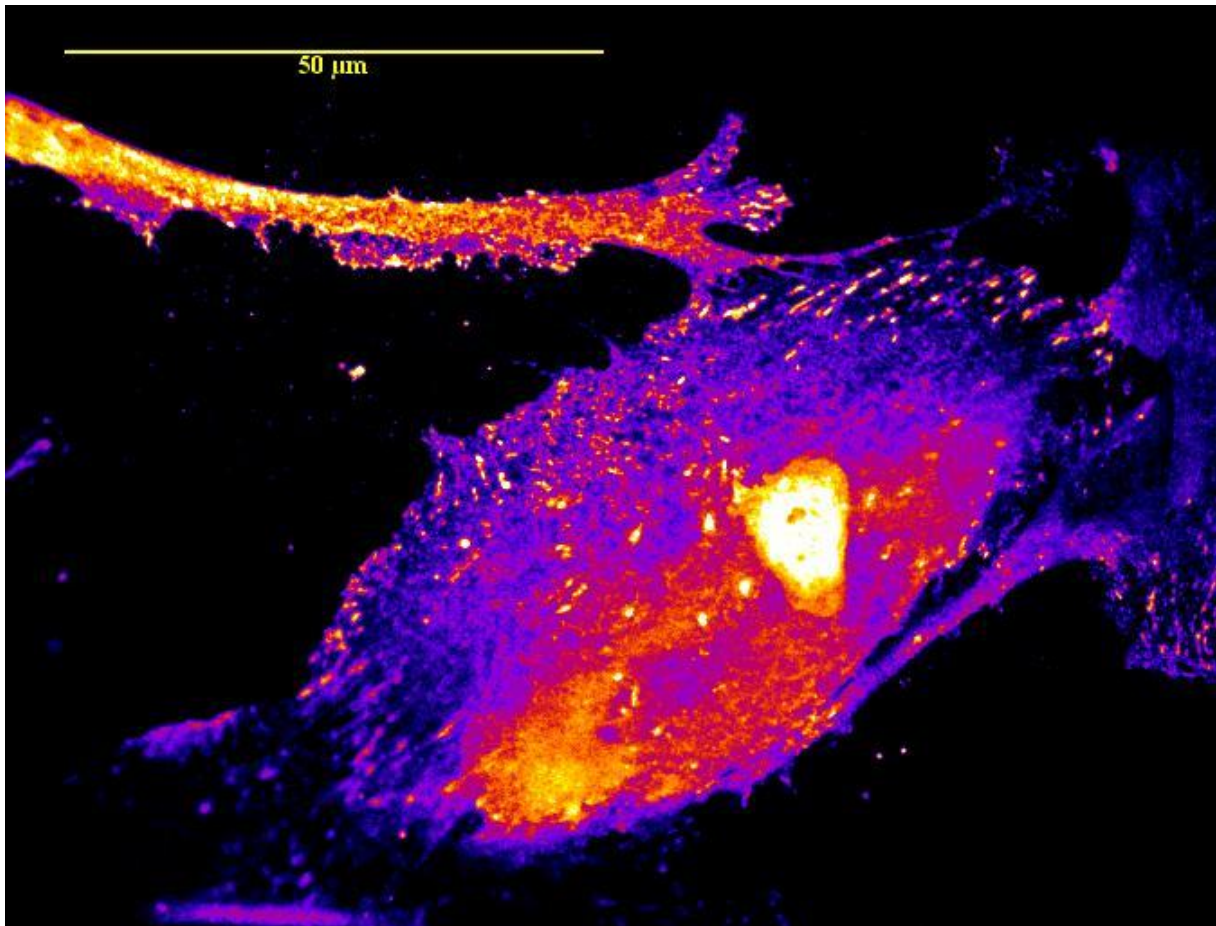


Abbildung 43: Beispiel 2 für Vinculin-Score II.

Es handelt sich um eine konfokale Fluoreszenzaufnahme, bei der das Vinculin in der ganzen Zelle verteilt ist. Je mehr Vinculin vorhanden, desto heller die Fluoreszenz an diesen Stellen.

Score III: „Vinculin nicht eindeutig zu erkennen.“

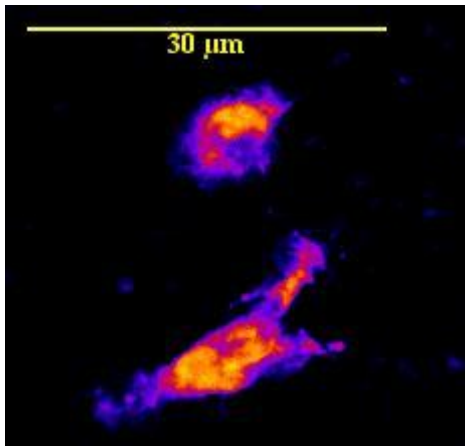


Abbildung 44: Beispiel 1 für Vinculin-Score III.

Es handelt sich um eine konfokale Fluoreszenzaufnahme, bei der das Vinculin nicht deutlich zu erkennen ist. Je mehr Vinculin vorhanden, desto heller die Fluoreszenz an diesen Stellen.

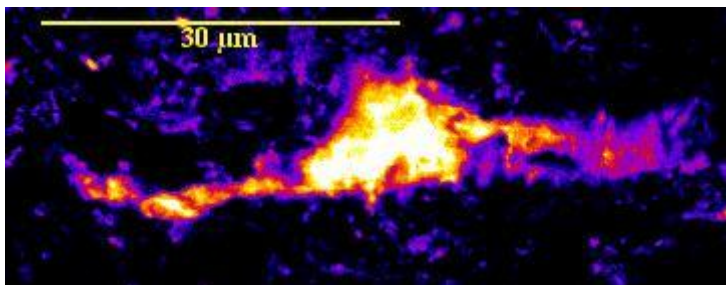


Abbildung 45: Beispiel 2 für Vinculin-Score III.

Es handelt sich um eine konfokale Fluoreszenzaufnahme, bei der das Vinculin nicht deutlich zu erkennen ist. Je mehr Vinculin vorhanden, desto heller die Fluoreszenz an diesen Stellen.

Zelltyp	Werkstoff	Oberfläche	Tag	Score 1		Score 2		Score 3	
				abs.	%	abs.	%	abs.	%
HGF	ZrO2	gestrahlt	1	14	45,2%	17	54,8%	0	0,0%
	ZrO2	gestrahlt	3	33	91,7%	3	8,3%	0	0,0%
	ZrO2	gestrahlt	5	33	100,0%	0	0,0%	0	0,0%
HGF	ZrO2	maschiniert	1	16	50,0%	13	40,6%	3	9,4%
	ZrO2	maschiniert	3	23	67,6%	5	14,7%	6	17,6%
	ZrO2	maschiniert	5	30	88,2%	4	11,8%	0	0,0%
HGF	ZrO2	poliert	1	15	48,4%	8	25,8%	8	25,8%
	ZrO2	poliert	3	29	78,4%	4	10,8%	4	10,8%
	ZrO2	poliert	5	34	100,0%	0	0,0%	0	0,0%
HGF	Titan	gestrahlt	1	37	97,4%	1	2,6%	0	0,0%
	Titan	gestrahlt	3	31	93,9%	2	6,1%	0	0,0%
	Titan	gestrahlt	5	37	97,4%	1	2,6%	0	0,0%
HGF	Titan	maschiniert	1	10	33,3%	4	13,3%	16	53,3%
	Titan	maschiniert	3	21	70,0%	4	13,3%	5	16,7%
	Titan	maschiniert	5	20	62,5%	12	37,5%	0	0,0%
HGF	Titan	poliert	1	4	13,3%	1	3,3%	25	83,3%
	Titan	poliert	3	8	26,7%	9	30,0%	13	43,3%
	Titan	poliert	5	33	94,3%	2	5,7%	0	0,0%
HNEpC-c	ZrO2	gestrahlt	1	0	0,0%	0	0,0%	38	100,0%
	ZrO2	gestrahlt	3	0	0,0%	0	0,0%	33	100,0%
HNEpC-c	ZrO2	maschiniert	1	0	0,0%	1	2,7%	36	97,3%
	ZrO2	maschiniert	3	0	0,0%	7	20,6%	27	79,4%
HNEpC-c	ZrO2	poliert	1	0	0,0%	0	0,0%	33	100,0%
	ZrO2	poliert	3	0	0,0%	3	9,1%	30	90,9%
HNEpC-c	Titan	gestrahlt	1	0	0,0%	0	0,0%	39	100,0%
	Titan	gestrahlt	3	0	0,0%	0	0,0%	30	100,0%
HNEpC-c	Titan	maschiniert	1	26	70,3%	11	29,7%	0	0,0%
	Titan	maschiniert	3	14	43,8%	18	56,3%	0	0,0%
HNEpC-c	Titan	poliert	1	0	0,0%	39	100,0%	0	0,0%
	Titan	poliert	3	7	26,9%	19	73,1%	0	0,0%

Tabelle 13: Übersicht über die Verteilung des Vinculins in den Fibroblasten und Epithelzellen auf allen Werkstoffen und Oberflächen.

Bei den Fibroblasten war das Vinculin auf dem ZrO₂ auf allen drei Oberflächen jeweils am Rand deutlich sichtbar, bis auf der gestrahlten Oberfläche an Tag 1. Hier fand sich das Vinculin in der ganzen Zelle verteilt. Bei dem Werkstoff Titan fand sich das Vinculin entweder deutlich am Zellrand oder in der ganzen Zelle verteilt, jedoch war es fast immer zuzuordnen. Auf der gestrahlten Oberfläche überwog immer Score 1. Das Vinculin war also deutlich am Rand der Zellen erkennbar. Auf der maschinieren Oberfläche überwog dieser Score an Tag 3 und 5, nicht aber an Tag

1. An diesem Tag ließ sich das Vinculin nicht eindeutig einteilen. Ebenso war es auf der polierten Oberfläche. An den Tagen 1 und 3 war Score 3 prozentual immer am höchsten vertreten, an Tag 5 dagegen Score 1.

Bei den Epithelzellen auf ZrO_2 war Score 1 auf allen drei Oberflächen nicht vertreten. Am häufigsten fand sich Score 3. Auf der gestrahlten Oberfläche an beiden Tagen sogar zu 100% und auf der polierten an Tag 1 zu 100%. Auf dem gestrahlten Titan war das Vinculin an beiden Tagen jeweils zu 100% nicht eindeutig einzuordnen. An Tag 1 überwog auf der maschinieren Oberfläche Score 1, an Tag 3 dagegen Score 2. Zu 100% fand sich auf dem polierten Titan an Tag 1 das Vinculin in der ganzen Zelle verteilt und auch an Tag 3 überwog Score 2.

3.9. Korrelationstests

Mit Hilfe der Korrelationstests soll untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen verschiedenen Variablen besteht. Ich benutze hierzu den Korrelationstest nach Spearman. Die entsprechenden Diagramme finden sich im Anhang wieder.

3.9.1. Fibroblasten

3.9.1.1. Fläche vs. Zellzahl (Titan)

Der Spearman-Test ergab einen Korrelationskoeffizienten (r) von 0,4167. Dies bedeutet, dass zwischen der Fläche und der Anzahl der Zellen auf Titan ein wahrscheinlicher linearer Zusammenhang besteht. Der p-Wert liegt dagegen bei 0,2696 und somit liegt keine signifikante Korrelation vor.

3.9.1.2. Fläche vs. Zellzahl (Zirkoniumdioxid)

Der Spearman-Test ergab einen Korrelationskoeffizienten (r) von 0,4000. Dies bedeutet, dass zwischen der Fläche und der Anzahl der Zellen auf Zirkoniumdioxid ein wahrscheinlicher linearer Zusammenhang besteht. Der p-Wert liegt dagegen bei 0,2912 und somit liegt keine signifikante Korrelation vor.

3.9.1.3. Fläche vs. Länge der Ausläufer (Titan)

Der Spearman-Test ergab einen Korrelationskoeffizienten (r) von 0,08333. Dies bedeutet, dass zwischen der Fläche und der Länge der Ausläufer auf Titan ein gering wahrscheinlicher linearer Zusammenhang besteht. Der p-Wert liegt dagegen bei 0,8432 und somit liegt keine signifikante Korrelation vor.

3.9.1.4. Fläche vs. Länge der Ausläufer (Zirkoniumdioxid)

Der Spearman-Test ergab einen Korrelationskoeffizienten (r) von 0,4051. Dies bedeutet, dass zwischen der Fläche und der Länge der Ausläufer auf Zirkoniumdioxid ein wahrscheinlicher linearer Zusammenhang besteht. Der p-Wert liegt dagegen bei 0,2696 und somit liegt keine signifikante Korrelation vor.

3.9.2. Epithelzellen

3.9.2.1. Fläche vs. Zellzahl (Titan)

Der Spearman-Test ergab einen Korrelationskoeffizienten (r) von -0,6571. Dies bedeutet, dass zwischen der Fläche und der Anzahl der Zellen auf Titan ein wahrscheinlicher linearer Zusammenhang besteht. Der p-Wert liegt dagegen bei 0,1750 und somit liegt keine signifikante Korrelation vor.

3.9.2.2. Fläche vs. Zellzahl (Zirkoniumdioxid)

Der Spearman-Test ergab einen Korrelationskoeffizienten (r) von 0,8286. Dies bedeutet, dass zwischen der Fläche und der Anzahl der Zellen auf Zirkoniumdioxid ein wahrscheinlicher linearer Zusammenhang besteht. Der p-Wert liegt dagegen bei 0,0583 und somit liegt keine signifikante Korrelation vor.

3.9.2.3. Fläche vs. Länge der Ausläufer (Titan)

Der Spearman-Test ergab einen Korrelationskoeffizienten (r) von -0,2571. Dies bedeutet, dass zwischen der Fläche und der Länge der Ausläufer auf Titan ein wahrscheinlicher linearer Zusammenhang besteht. Der p-Wert liegt dagegen bei 0,6583 und somit liegt keine signifikante Korrelation vor.

3.9.2.4. Fläche vs. Länge der Ausläufer (Zirkoniumdioxid)

Der Spearman-Test ergab einen Korrelationskoeffizienten (r) von -0,4857. Dies bedeutet, dass zwischen der Fläche und der Länge der Ausläufer auf Zirkoniumdioxid ein wahrscheinlicher linearer Zusammenhang besteht. Der p-Wert liegt dagegen bei 0,3556 und somit liegt keine signifikante Korrelation vor.

3.9.3. Fibroblasten

3.9.3.1. Fläche vs. Vinculin-Klasse (Titan)

Der Spearman-Test ergab einen Korrelationskoeffizienten (r) von 0,8320. Dies bedeutet, dass zwischen der Fläche und der Vinculin-Klasse auf Titan ein wahrscheinlicher linearer Zusammenhang besteht. Der p-Wert liegt bei 0,0083 und somit liegt eine signifikante Korrelation vor.

3.9.3.2. Fläche vs. Vinculin-Klasse (Zirkoniumdioxid)

Der Spearman-Test ergab einen Korrelationskoeffizienten (r) von -0,4100. Dies bedeutet, dass zwischen der Fläche und der Vinculin-Klasse auf Zirkoniumdioxid ein gering wahrscheinlicher linearer Zusammenhang besteht. Der p-Wert liegt dagegen bei 0,2696 und somit liegt keine signifikante Korrelation vor.

3.9.4. Epithelzellen

3.9.4.1. Fläche vs. Vinculin-Klasse (Titan)

Der Spearman-Test ergab einen Korrelationskoeffizienten (r) von 0,8117. Dies bedeutet, dass zwischen der Fläche und der Vinculin-Klasse auf Titan ein wahrscheinlicher linearer Zusammenhang besteht. Der p-Wert liegt dagegen bei 0,0583 und somit liegt keine signifikante Korrelation vor.

3.9.4.2. Fläche vs. Vinculin-Klasse (Zirkoniumdioxid)

Der Spearman-Test ergab einen Korrelationskoeffizienten (r) von -0,8804. Dies bedeutet, dass zwischen der Fläche und der Vinculin-Klasse auf Zirkoniumdioxid ein wahrscheinlicher linearer Zusammenhang besteht. Der p-Wert liegt bei 0,0333 und somit liegt eine signifikante Korrelation vor.

3.9.4.3. Übersicht Korrelationstests

	Titan/HGF1	ZrO ₂ /HGF1	Titan/HNEpC-c	ZrO ₂ /HNEpC-c
Fläche vs. Zellzahl	x	x	x	x
Fläche vs. Länge Ausläufer	x	x	x	x
Fläche vs. Vinculin-Klasse	✓	x	x	✓

„x“ bedeutet, dass keine signifikante Korrelation vorliegt. Dagegen steht „✓“ für das Vorliegen einer signifikanten Korrelation.

3.10. Zusammenfassung der Ergebnisse

3.10.1. Zellzahl

HGF/Titan

1. Auf allen Oberflächen erhöhte sich zunächst die durchschnittliche Zellzahl. An Tag 5 war sie jedoch kleiner als an Tag 1.
2. Auf der polierten Oberfläche war die Zellzahl stets am höchsten.
3. Auf der maschinieren Oberfläche war die Zellzahl stets am niedrigsten.

HGF/ZrO₂

1. Auf allen Oberflächen erhöhte sich die durchschnittliche Zellzahl zunächst. Auf der gestrahlten und maschinieren Oberfläche war die Anzahl an Tag 5 geringer als an Tag 1. Auf der polierten lag der Wert von Tag 5 zwar unter dem von Tag 3, aber trotzdem noch über dem von Tag 1.
2. Auf der maschinieren Oberfläche war die Zellzahl stets am niedrigsten.

HNEpC-c/Titan

1. Auf allen Oberflächen erhöhte sich die durchschnittliche Zellzahl zunächst, an Tag 5 befanden sich jedoch keine Zellen mehr auf den verschiedenen Zylindern.
2. Auf der gestrahlten Oberfläche war die Zellzahl stets am höchsten.
3. Auf der polierten Oberfläche war die Zellzahl stets am niedrigsten.

HNEpC-c/ZrO₂

1. Auf allen Oberflächen erhöhte sich die durchschnittliche Zellzahl zunächst, an Tag 5 befanden sich jedoch keine Zellen mehr auf den verschiedenen Zylindern.
2. Auf der maschinieren Oberfläche war die Zellzahl stets am höchsten.

Fazit:

Die Fibroblasten vermehrten sich auf der polierten Titanoberfläche am stärksten.

Die Epithelzellen vermehrten sich auf der gestrahlten Titanoberfläche und der maschinieren Zirkoniumdioxidoberfläche am stärksten.

3.10.2. Fläche/Ausläufer

HGF/ZrO₂

Auf der polierten Oberfläche war die Fläche an allen 3 Tagen am größten.

1. Sowohl bei der gestrahlten, als auch bei der maschinieren Oberfläche nahm die Fläche von Tag 1 über Tag 3 bis hin zu Tag 5 ab.
2. Auf der polierten Oberfläche nahm die Fläche von Tag 1 zu Tag 3 hin erst leicht zu und fiel zu Tag 5 hin sogar unter den Wert von Tag 1.
3. Die Länge der Ausläufer nahm auf der gestrahlten Oberfläche von Tag 1 auf Tag 3 zu, um dann an Tag 5 wieder abzufallen.
4. Auf der maschinieren Oberfläche nahm die Länge der Ausläufer, im Gegensatz zur polierten Oberfläche, an jedem Messtag zu. Auf der polierten nahm sie an jedem Messtag ab.

HGF/Titan

1. Auf allen 3 Oberflächen stieg die Fläche der Zellen von Tag 1 auf Tag 3 erst an und fiel dann von Tag 3 auf Tag 5 hin wieder ab.
2. Auf der maschinerten und polierten Oberfläche fiel der Wert sogar unter den Wert von Tag 1.
3. Auf der gestrahlten Oberfläche sank der Wert zu Tag 5 zwar auch, aber er lag noch über dem Wert von Tag 1.
4. Die Länge der Ausläufer nahm auf der gestrahlten und maschinerten Oberfläche von Tag 1 zu Tag 3 und Tag 5 ab.
5. Auf der polierten Oberfläche war dagegen eine ständige Längenzunahme zu beobachten.

HNEpC-c/ZrO₂

1. Alle Oberflächen zeigten in Bezug auf die Fläche ein gleiches Verhalten. Von Tag 1 auf Tag 3 nahm die Fläche jeweils zu.
2. Die Zellen auf der gestrahlten Oberfläche hatten immer die kleinste Fläche.
3. Die Zellen auf der maschinerten Oberfläche hatten immer die größte Fläche.
4. Die Länge der Ausläufer nahm von Tag 1 auf Tag 3 auf der gestrahlten sowie der maschinerten Oberfläche ab.
5. Die Länge der Ausläufer nahm von Tag 1 auf Tag 3 auf der polierten Oberfläche zu.
6. Die Ausläufer waren auf der gestrahlten Oberfläche immer am längsten.

HNEpC-c/Titan

1. Wie beim Zirkoniumdioxid nahm die Fläche auf allen 3 Oberflächen die Fläche von Tag 1 auf Tag 3 zu.
2. Auf der gestrahlten Oberfläche war die Fläche stets am kleinsten.
3. Auch nahm die Länge der Ausläufer auf allen Oberflächen von Tag 1 zu Tag 3 zu.

Fazit:

Auf der polierten Titanoberfläche fand sich eine ständige Längenzunahme der Fibroblastenausläufer.

Auf der polierten Zirkoniumdioxidoberfläche war die Zellfläche der Fibroblasten stets am größten.

Die Flächen der Epithelzellen waren bei direktem Vergleich beider Werkstoffe auf der polierten Titanoberfläche am größten. In Bezug auf Zirkoniumdioxid waren sie auf der maschinieren Oberfläche am größten. Die Ausläufer der Epithelzellen waren dagegen auf der gestrahlten Zirkoniumdioxidoberfläche am längsten.

3.10.3. Direkter Vergleich der Oberflächen

Die Anzahl der Zellen auf den verschiedenen Werkstoffen und Oberflächen unterschieden sich stets signifikant. Bei den Fibroblasten war die Anzahl der Zellen bis auf der polierten Titanoberfläche auf allen ZrO_2 -Oberflächen höher.

Bei den Epithelzellen zeigten die Zellen auf der polierten und maschinieren ZrO_2 -Oberfläche die höchste Anzahl, auf der gestrahlten Oberfläche war die Zellzahl dagegen beim Titan am höchsten.

3.10.4. Vinculin

HGF/ ZrO_2 :

1. Auf der maschinieren und polierten Oberfläche war das Vinculin prozentual meistens am Zellrand zu sehen.
2. Die gestrahlte Oberfläche entsprach der maschinieren und polierten Oberfläche, jedoch nicht an Tag 1. An diesem Tag fand sich das Vinculin am häufigsten in der ganzen Zelle verteilt.

HGF/Titan:

1. Das Vinculin war auf allen Oberflächen entweder am Zellrand oder in der ganzen Zelle verteilt zu erkennen.
2. Auf der gestrahlten Oberfläche war das Vinculin prozentual meistens am Zellrand zu sehen.

3. Auf der maschinieren war das Vinculin prozentual meistens am Zellrand zu sehen, außer an Tag 1. An diesem Tag war es nicht eindeutig zuzuordnen.
4. Auf der polierten Oberfläche war das Vinculin prozentual meistens am Zellrand oder in der ganzen Zelle verteilt zu sehen, außer an Tag 5. An diesem Tag war das Vinculin prozentual meistens am Zellrand zu sehen.

HNEpC-c/ZrO₂:

1. Auf der gestrahlten Oberfläche war das Vinculin an beiden Tagen zu 100% nicht eindeutig zuzuordnen.
2. Auf der maschinieren und polierten Oberfläche war das Vinculin prozentual meistens ebenfalls nicht eindeutig zuzuordnen.

HNEpC-c/Titan:

1. Auf der gestrahlten Oberfläche war das Vinculin an beiden Tagen zu 100% am Zellrand zu sehen.
2. Auf der maschinieren Oberfläche war das Vinculin an Tag 1 prozentual meistens am Zellrand zu sehen, an Tag 3 war es dagegen prozentual am meisten in der ganzen Zelle verteilt.
3. Auf der polierten Oberfläche war das Vinculin an Tag 1 zu 100% in der ganzen Zelle verteilt zu sehen und an Tag 3 war es dagegen prozentual auch am meisten in der ganzen Zelle verteilt.

3.10.5. Korrelationen

HNEpC-c/ZrO₂/Vinculin

Mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % liegt eine signifikante Korrelation zwischen der Fläche und der Vinculin-Klasse vor.

HGF1/Titan/Vinculin

Mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % liegt eine signifikante Korrelation zwischen der Fläche und der Vinculin-Klasse vor.

Ziel dieser Studie war es, das Proliferations- und Adhäsionsverhalten von Epithelzellen und Fibroblasten auf verschiedenen strukturierten Oberflächen von Titan und Zirkoniumdioxid zu untersuchen.

Entgegen aller Erwartungen nahm die Anzahl der Zellen, Epithelzellen wie auch Fibroblasten, an den drei Messtagen nicht stetig zu. Zwar kam es von Tag 1 auf Tag 3 bei einigen Bedingungen zur Zunahme der Zellzahl, jedoch fiel diese zu Tag 5 immer ab, bzw. es waren an Tag 5 keine Zellen mehr vorhanden. Da dies jedoch bei allen Bedingungen aufgetreten ist, kann man davon ausgehen, dass irgendein Sachverhalt Einfluss auf das Zellwachstum nahm. Um auszuschließen, dass es sich um einen Fehler bei der Kultivierung handelt, habe ich die Zellen zusätzlich auf Plastikzylindern ausgesät. Auf diesen fanden sich die Zellen auch noch an Tag 5. Die Zylinder wurden auch nicht so dicht besiedelt, dass es bereits an Tag 5 zu einer vollständigen Besiedelung der Oberflächen kam und die Zellen noch genügend Platz zum Wachsen und Proliferieren hatten. Wie bei der Zellzahl nahm auch die Größe der Zellen beider Zelltypen von Tag 1 auf Tag 3 erst zu und fiel auf Tag 5 hin wieder ab. Die Korrelationstests bezüglich der Größe der Zellen und deren Anzahl zeigten, dass ein wahrscheinlich linearer Zusammenhang zwischen den beiden Größen besteht, jedoch keine signifikante Korrelation. Des Weiteren wäre zu vermuten gewesen, dass eine große Zelle mehr und längere Ausläufer ausbildet. Jedoch zeigte auch dieser Korrelationstest zwar einen wahrscheinlich linearen Zusammenhang, aber keine signifikante Korrelation.

4. Diskussion

Die Ergebnisse mit bereits bestehenden Ergebnissen aus der Literatur zu vergleichen oder gar zu bestätigen ist nicht leicht möglich, da sich neben den Versuchsmodellen auch die Zelltypen sehr häufig unterscheiden. Zudem werden bei einer Großzahl der *in vitro* Untersuchungen unterschiedliche Materialien, wie zum Beispiel Silikone, Polystyrene, Perspex, Epoxidharze, Titanlegierungen usw., verwendet. Solche Materialien unterscheiden sich neben ihrer Oberflächentopographie auch in ihrer Oberflächenchemie. Man muss deshalb davon ausgehen, dass die bis heute beobachteten Unterschiede bezüglich des Zellverhaltens auf unterschiedlichen Oberflächen auf die Materialeigenschaften des jeweiligen Werkstoffes zurückzuführen sind.

Es gab bereits mehrere *in vitro* und *in vivo* Studien, die sich mit diesem Thema befassten. So untersuchte die Gruppe um Baharloo (Baharloo et al. 2005) das Wachstums- und Adhäsionsverhalten sowie den Membran-Oberflächen-Abstand von Epithelzellen auf einer glatten Plastikoberfläche sowie einer glatten, einer polierten, einer rauen-sandgestrahlten, einer säuregeätzten sowie einer sandgestrahlten und säuregeätzten Titanoberfläche. Die Zellen wurden je nach Kulturgröße an den Tagen 1, 2, 3, 4 und 5 bzw., an den Tagen 1, 3, 7, 14 und 28 gezählt. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass glatte Oberflächen das Wachstum, die Streuung und die Adhäsion der Epithelzellen begünstigen. Die glatte Plastikoberfläche diente auch als Kontrolloberfläche, um die Ergebnisse besser mit anderen Studien vergleichen zu können. Von Tag 1 auf Tag 5 stellte die Arbeitsgruppe fest, dass es eine zehnfache Zunahme der Epithelzellen gab. Auf der entsprechenden Titanoberfläche betrug die Zunahme nur das Fünffache. Auf den rauen Oberflächen ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Tag 5 und Tag 1 feststellen.

Bei meinen Untersuchungen habe ich zu Kontrollzwecken Epithelzellen, als auch Fibroblasten auf Kunststoffzylindern ausgesät und die Zellzahl bestimmt. Beide Zelltypen wuchsen auf der Kunststoffoberfläche gut an und die Zellzahl erhöhte sich von Messtag zu Messtag (Tag 1, Tag 3 und Tag 5). Bei der Epithelzellen erhöhte sich die Anzahl der Zellen auf der Kontrolloberfläche von Tag 1 auf Tag 3 um das 1,3-fache, von Tag 1 auf Tag 5 dagegen um das 2,4-fache.

Ein ähnliches Ergebnis wie die Gruppe um Baharloo erhielt die Gruppe um Hormia (Hormia et al. 1991). Sie kamen mit Hilfe von Immunfluoreszenztechniken zu dem

Ergebnis, dass gingivale Epithelzellen auf einer glatten Titanoberfläche besser haften und sich verbreitern als auf einer rauen, sandgestrahlten Titanoberfläche. Darüber hinaus untersuchte die Arbeitsgruppe um Cochran (Cochran et al. 1994) das Wachstum und die Anlagerung parodontaler Zellen auf glattem und rauem Titan. Sie beobachteten, dass nach einer gewissen Zeit der Anheftung die Zellen stärker auf der glatten als auf der rauen Titanoberfläche proliferierten. Die Gruppe um Baharloo (Baharloo et al. 2005) untersuchte auch die Fläche der Zellen und kam zu folgendem Ergebnis: auf den glatten Oberflächen, den Kontrolloberflächen sowie den glatten Titanoberflächen, gab es keine signifikanten Unterschiede in Fläche/Zelle für jede Zellkategorie. Auf der Kunststoffkontrolloberfläche, der glatten, der polierten, der rauen, sandgestrahlten und der säuregeätzten Titanoberfläche war die Fläche/Zelle isolierter Zellen größer als auf der Titanoberfläche, die sowohl sandgestrahlt, als auch säuregeätzt wurde. Zwischen der polierten, der säuregeätzten und der rauen, sandgestrahlten Titanoberfläche fanden sie keine signifikanten Unterschiede. Generell konnten sie aussagen, dass die Epithelzellen auf der glatten Kunststoffkontrolloberfläche, der glatten, der polierten und der säuregeätzten Titanoberfläche mehr eben und gleichmäßiger verstreut vorzufinden sind als bei einer rauen, sandgestrahlten und einer sandgestrahlten und säuregeätzten Titanoberfläche. Bei meinen Untersuchungen erhielt ich ebenfalls das Ergebnis, dass die Epithelzellen am 3. Tag die größte Fläche/Zelle auf der polierten Titanoberfläche aufwiesen. Auf der gestrahlten Titanoberfläche war die Fläche/Zelle stets am kleinsten. Neben den bereits angesprochenen Punkten untersuchte die Gruppe um Baharloo (Baharloo et al. 2005) auch die fokale Adhäsion mittels des immunfluoreszierenden Leuchtens von Vinculin. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die epitheliale Adhäsion an glatten Oberflächen deutlich stärker ausgeprägt ist als an rauen Oberflächen. Bei meinen Versuchen beobachtete ich, dass bei den Epithelzellen auf der gestrahlten Titanoberfläche die Adhäsionspunkte nicht deutlich erkennbar und einzuordnen waren. Auf der maschinieren Titanoberfläche fanden sich die Adhäsionspunkte entweder am Zellrand verteilt oder in der ganzen Zelle. Die Zellen auf der polierten Oberfläche dagegen wiesen fast nur in der Zelle verteilte Adhäsionspunkte auf. Die fokalen Adhäsionspunkte werden mit der Stärke der Zelladhäsion in Verbindung gebracht (Richards et al. 2001; Lotz et al. 1989; Hinz et al. 2003). Dies spricht dann also dafür, dass die Zellen mit den meisten Adhäsionspunkten am besten auf der entsprechenden Oberfläche haften.

Räisänen (Räisänen et al. 2000) untersuchten das Adhäsionsverhalten kultivierter Epithelzellen (HaCaT) auf fünf verschiedenen, in der Zahnmedizin verwendeten, Materialien und auf Glas. Das Haftungsverhalten wurde mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops und Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Vinculin und dem $\alpha 6 \beta 4$ Integrin ausgewertet. Ihren Ergebnissen zufolge haften die Epithelzellen wesentlich besser auf metallischen Oberflächen (Titan, Ti6Al4V Titanlegierung und Goldlegierungen) als auf keramischen Oberflächen (Dentalporzellan von Shofu Inc., Tokyo und Aluminiumoxid). Das Rasterelektronenmikroskop zeigte, dass die Zellen auf der metallischen Oberfläche mehr abgeflacht waren und auf diesen Oberflächen mehrzellige Inseln bildeten. Auf Porzellan und Aluminiumoxid besaßen die Zellen eher ein rundliches Aussehen und traten als Einzelzellen auf. Die Immunfluoreszenzuntersuchung der Zellen zeigte gut ausgebildetes Vinculin im Bereich der fokalen Adhäsionspunkte auf den metallischen Oberflächen, im Gegensatz zu den keramischen Oberflächen, auf denen die Haftkomplexe weniger gut ausgeprägt erschienen. Diese Ergebnisse zeigten, dass glatte metallische Materialien optimal für die epitheliale Zelladhäsion und Verbreiterung sind. Die Zellzahlen waren auf den metallischen Oberflächen stets höher. Dies deckt sich jedoch nicht mit den Ergebnissen meiner Untersuchungen. Die Anzahl der Epithelzellen war nur auf der gestrahlten Titanoberfläche höher als auf den verschiedenen Zirkoniumdioxidoberflächen. Die Ergebnisse von Räisänen stehen jedoch in Widerspruch zu einer früheren Untersuchung der Arbeitsgruppe um Kasten (Kasten et al. 1990). Sie verwendeten jedoch eine Oberfläche aus aufgerautem monokristallinem Al_2O_3 anstelle von polykristallinem Al_2O_3 und untersuchten die Zellzahl, aber nicht die Bedeckung der Oberfläche durch die Zellen. Ebenfalls im Widerspruch mit dem Ergebnis von Räisänen steht ein früheres Ergebnis der Gruppe um Jansen (Jansen et al. 1985). Sie zeigten mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen, dass sich Hemidesmosomen bei Zellen auf den jeweils polierten und mit Ultraschall gereinigten keramischen Oberflächen, jedoch nicht bei Zellen auf dem entsprechenden Titan, ausbildeten. Es ist natürlich möglich, dass die verschiedenen Ergebnisse dadurch zustande kommen, dass verschiedene Epithelzellen sich in Kultur verschieden verhalten. Auch können die Unterschiede bezüglich der Zelladhäsion bei verschiedenen Ergebnissen auf Unterschiede in der Materialtopographie zurückzuführen sein.

Könönen (Könönen et al. 1992) untersuchte die Haftung, Ausrichtung und Proliferation humaner Gingivafibroblasten auf elektropolierten, geätzten und sandgestrahlten Titanoberflächen. Die Gingivafibroblasten vermehrten sich zwar auf allen Oberflächen, jedoch zeigten die Zellen auf der elektropolierten Oberfläche eine extrem flache Morphologie und schienen Zellbrücken zu benachbarten Zellen auszubilden. Auf der gestrahlten und geätzten Oberfläche waren die Zellen eher rund und länglich und besaßen viele lange Ausläufer. Vinculinhaltige Fokalkontakte fanden sich hauptsächlich auf der elektropolierten und geätzten Titanoberfläche. Das Endergebnis besagt, dass glatte oder fein geriffelte Titanoberflächen die Anlage sowie das Wachstum von humanen gingivalen Fibroblasten unterstützen. Bei meinen Untersuchungen war auf der polierten Titanoberfläche das Vinculin der Fibroblasten an Tag 1 größtenteils nicht eindeutig zu erkennen, an Tag 3 war das Vinculin meist entweder nicht eindeutig zu erkennen oder in der ganzen Zelle verteilt. Erst an Tag 5 war es dagegen fast nur deutlich am Zellrand sichtbar. Dieser Unterschied könnte aus feinen Unterschieden bei der Oberflächenherstellung herrühren. Denn keine Oberfläche gleicht exakt der anderen. Bereits minimalste Unterschiede könnten die Ergebnisse beeinflussen. Zu einem ähnlichen Ergebnis wie die Arbeitsgruppe um Könönen kam auch Hormia (Hormia et al. 1994). Sie fanden heraus, dass vinculinhaltige Fokalkontakte nach 4 und nach 24 Stunden nach Aussäen der Zellen auf elektropolierten und geätzten Titanoberflächen sowie auf der Kontrolloberfläche Glas vorhanden waren, jedoch nicht auf der sandgestrahlten Titanoberfläche. Auf der sandgestrahlten Titanoberfläche fanden sich Integrin Untereinheiten nur diffus verteilt. Sie zeigten, dass die Oberflächenstruktur eines Materials die Integrin-Untereinheiten-Expression humaner Gingivafibroblasten beeinflusst. Glatte und feingeriffelte Titanoberflächen scheinen dabei das Wachstum der Fibroblasten am besten zu unterstützen. Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu meinem, da bei mir das Vinculin auf der gestrahlte Titanoberfläche bei den Fibroblasten gut am Zellrand sichtbar war. Dieser Unterschied könnte ebenfalls auf kleine Unterschiede in der Oberflächenbearbeitung der Werkstoffe zurückzuführen sein.

Pae (Pae et al. 2009) untersuchte in seiner Studie die Haftung, Proliferation und genetische Auswirkung von humanen gingivalen Fibroblasten auf Titan und Zirkon mit unterschiedlichen Oberflächen. Die Zellen wurden auf Titan-Discs mit einer maschinellierten Fläche, Yttrium-stabilisiertem tetragonalen Zirkonoxid Polykristallen mit einer glatten Oberfläche und Yttrium-stabilisiertem tetragonalen Zirkonoxid

Polykristallen mit 100 µm Rillen kultiviert. Die Aktivität der Zellproliferation wurde mittels eines MTT-Tests ermittelt. Alle Gruppen zeigten nach 48 Stunden eine erhöhte Zellproliferationsaktivität, jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die ausgesäten gingivalen Fibroblasten zeigten auf dem Titan und dem Zirkonium(di)oxid einen ähnlichen Grad an Vitalität und Proliferation.

Takamori (Takamori et al. 2008) untersuchte ebenfalls, wie sich die Rauheit von Zirkoniumdioxid und Titan auf die Fibroblastenadhäsion auswirkt. Sie bestimmten die Zellzahl 4 und 24 Stunden nach dem Aussäen auf Polystrol (Kontrolloberfläche), teilstabilisierter Zirkonoxidkeramik, stabilisierter Zirkonoxidkeramik und reinem Titan. Die Arbeitsgruppe um Takamori kam zu zwei wesentlichen Ergebnissen:

Nach 4 Stunden fand sich kein Unterschied in der Anzahl angehefteter Fibroblasten auf der Kontrollplatte und der teilstabilisierten Zirkonoxidkeramik ($p > 0,05$). Auf der stabilisierten Zirkonoxidkeramik und dem reinen Titan war die Anzahl der angehefteten Fibroblasten signifikant kleiner als auf der Kontrollplatte ($p < 0,05$). Dieser Unterschied war im Vergleich zur teilstabilisierten Zirkonoxidkeramik noch deutlich ausgeprägter ($p < 0,01$).

Nach 24 Stunden wurde ein Anstieg der Zellzahlen beobachtet, aber dieser Anstieg war nicht signifikant. Die Anzahl der adhärenen Zellen auf der stabilisierten Zirkonoxidkeramik und dem reinen Titan war signifikant kleiner als auf der Kontrollplatte ($p < 0,05$).

Diese Studie zeigte also, dass sich mehr Zellen auf der glatten Oberfläche anhefteten (Polystrol und teilstabilisierte Zirkonkeramik ($R_a: 0,09 \mu\text{m}$)) als auf dem reinen Titan ($R_a: 0,88 \mu\text{m}$) und der stabilisierten Zirkonoxidkeramik ($R_a: 30,93 \mu\text{m}$) und das zu beiden Messpunkten.

Borghetti (Borghetti et al. 2005) fand bei seinen Untersuchungen heraus, dass das Anheften von Osteoblasten, die Adhäsion, Zellproliferation, Differenzierung, Synthese der Matrix und die Produktion von Wachstumsfaktoren von der Rauigkeit der Titanoberfläche abhängt.

Die genaue Rolle, welche die Oberflächenrauigkeit bei der Zellproliferation spielt, ist noch nicht geklärt, da verschiedene Studien Verschiedenes aussagen. So sagen manche Studien, wie zum Beispiel die von Sader (Sader et al. 2005), dass bei glatten Oberflächen die Zellproliferation (in diesem Fall von Osteoblasten) steigt.

O'Keefe et al. (1985) zeigte mit seinen Untersuchungen, dass Kollagen vom Typ I und IV sowie humanes lösliches Plasmafibronektin je nach Konzentration und Inkubationszeit effektive Agentien für eine verbesserte Ausbreitung der Hautzellen sind. Für den Einheilungsprozess von Implantaten kann folglich das Vorkommen dieser extrazellulären Matrixproteine genutzt werden. Sowohl die Produktion von Fibronektin, als auch die Produktion von Kollagen und die zelluläre Antwort darauf sind bei Keratinozyten und Fibroblasten gleich. Dies zeigt, dass Kollagen und Fibronektin als Matrixfaktoren für beide Zelltypen dienen können (O'Keefe, et al. 1985). Eine Beschichtung der Implantatoberflächen mit Kollagen würde so für eine verstärkte Zelladhäsion und Proliferation sorgen. Dies zeigte auch Curtis et al. (1992) mit verschiedenen Beschichtungstest von Kontaktflächen. Sie wiesen eine gesteigerte Zelladhäsion sowie eine verbesserte Zellausbreitung in Gegenwart von Fibronektin nach. Sie zeigten jedoch auch, dass eine Abnahme der Zellaktivität unter dem Einfluss von BSA zu verzeichnen war. BSA ist ein bovines Serumprotein, auf welches in Nährlösungen von Zellkulturen nicht zu verzichten ist. Dies wird auch durch die Ergebnisse meiner Studie bestätigt. Die Zellzahl nahm vom ersten bis zum zweiten Messtag hin zu, dann aber wieder ab. Am Anfang würde es sich bei den Zellen noch nicht so bemerkbar machen, dass gewisse Faktoren fehlen, die sich *in vivo* ganz natürlich auf dem „Substrat“, an dem sich die Zellen anheften, befinden. Je länger die Zellen jedoch auf den Oberflächen *in vitro* wachsen, desto mehr würde sich dieses Fehlen von Faktoren bemerkbar machen. Da die verwendeten Zelltypen auf das Wachstum auf Plastikoberflächen „spezialisiert“ sind, wuchsen sie auf den Kontrollzylindern aus Kunststoff stetig weiter.

Über Integrine, spezifische Oberflächenrezeptoren der Zellen, bindet Kollagen vom Typ I Osteoblasten. Baslé et al. (1998) kultivierten Osteoblast-like-cells auf Biomaterial aus Rinderknochen, welches zuvor mit Kollagen vom Typ I beschichtet wurde. Nach 14 Tagen wurde die Oberfläche dieses Biomaterials untersucht und sie stellten fest, dass die Oberfläche durch eine Zellschicht bedeckt war. Auf der anderen Seite wurden die Zellen auch auf einem zuvor entproteinisierten Biomaterial kultiviert. Nach 14 Tagen wurde auch diese Oberfläche untersucht und es stellte sich heraus, dass weder eine spezifische Verbindung zwischen den Zellen und dem Biomaterial vorlag, noch besiedelten die Zellen die komplette Oberfläche des Biomaterials. Diese Studie bestätigt auch die von mir erhaltenen Ergebnisse, dass bei Oberflächen, welche vor einer Zellbesiedelung nicht mit extrazellulären Matrixproteinen

beschichtet wurden, die Zellproliferation nicht stark genug ist, um nach einer gewissen Zeit die gesamte Oberfläche zu besiedeln.

Um auszuschließen, dass es durch Fehler in den von mir verwendeten Methoden zu falschen Ergebnissen kommt, wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Nur so lässt sich auch sagen, dass es sich bei den hier vorliegenden Ergebnissen um diesbezüglich unverfälschte Ergebnisse handelt. Ergebnisse, die nicht den Erwartungen entsprachen lassen sich auf die bereits angesprochenen Unterschiede der *in vivo* und *in vitro* Bedingungen zurückführen. Die einzelnen Bestandteile des Versuchsaufbaus (Silikonkissen, Abstandhalter, Zylinder) wurden in Zellkulturflaschen gegeben, um zu sehen, ob die Zellen trotzdem weiter wachsen oder ob es zu Wechselwirkungen kommt, welche die Zellproliferation hemmen. Jedoch wuchsen die Zellen ganz normal weiter. Um herauszufinden, welche Zelldichte sich am besten als Ausgangskonzentration eignet, wurden vor Beginn der Versuche verschiedene Zelldichten ausgetestet. Die Zelldichte durfte weder zu hoch, noch zu niedrig sein. Bei einer zu niedrigen Zelldichte kann es dazu kommen, dass die Zellen erst gar nicht richtig wachsen, bei einer zu hohen wären die Zylinder bereits am zweiten Messtag zu stark bewachsen gewesen, so dass ein genaues Auszählen und eine weitere Proliferation der Zellen nicht möglich gewesen wäre. Die allgemeinen Bedingungen meiner verwendeten Methoden waren folglich adäquat. Zudem wurde parallel eine Versuchsreihe mit Kunststoffzylindern angelegt. Auf diesen wurde die gleiche Konzentration an Zellen ausgesät wie auf den übrigen Zylindern und sie wurden exakt wie diese behandelt.

Man muss berücksichtigen, dass es sich bei meinen Untersuchungen des zellulären Verhaltens um *in vitro* Untersuchungen handelt. Um genügend Zellmaterial zu erhalten werden die Zellen zunächst stark vermehrt. Diese extreme Vermehrung entspricht jedoch nicht dem natürlichen Verhalten der Zellen. Um bestimmte Funktionen ausüben zu können, liegen die Zellen im Gewebe meist differenziert vor und nur bei Bedarf kommt es zu einer Zellteilung. So sollte das Ziel der Implantologie sein, einen Werkstoff zu finden, auf welchem sich die Zellen möglichst natürlich verhalten. Denn es kann auch besser sein, weniger Zellen, aber dafür stärker differenzierte Zellen zu haben. Es reicht nicht aus, einen Werkstoff nur hinsichtlich der Zellproliferationsrate und Anzahl der auf ihm befindlichen Zellen zu beurteilen.

Des Weiteren sollte nicht nur die Anzahl von Adhäsionspunkten untersucht werden, sondern auch die Stärke der Adhäsion. Mit einem Rheometer lässt sich die Kraft

messen, welche benötigt wird, um Zellen von einer Oberfläche, auf welcher sie gewachsen sind, abzulösen. Mit diesem Gerät lässt sich shear stress einer definierten Stärke erzeugen. Während diese Kraft auf die Zellen wirkt, werden diese mit einer Kamera beobachtet. Dies wäre für zukünftige Untersuchungen, welche sich mit dem Adhäsionsverhalten der Zellen auseinandersetzen, von großem Interesse.

Die Art und Weise wie ein Implantat von Zellen besiedelt wird reicht jedoch nicht aus, um sagen zu können, ob die Implantatinserion von Erfolg sein wird. Ebenfalls von großer Wichtigkeit sind die Belastungsverhältnisse an der Grenzlinie zwischen Gewebe und Implantat, die Implantatapplikation und die Verweildauer des Implantats. Diese Aspekte lassen sich jedoch nur am lebenden Organismus untersuchen. Denn die Bedingungen einer *in vitro* Untersuchung unterscheiden sich immer von denen einer *in vivo* Untersuchung.

Kommt es zu einem Herabwachsen des Epithels entlang des Implantats, so kommt es folglich auch zu einer periimplantären Taschenbildung, was wiederum als eine der Hauptursache einer periimplantären Entzündung angesehen wird. Dies ist auch ein Grund dafür, weshalb der Fibroblastenadhäsion eine so große Bedeutung zugeschrieben wird. Da nun verschiedene Oberflächen und Werkstoffe das Proliferationsverhalten von Epithelzellen und Fibroblasten unterschiedlich beeinflussen, sollte man untersuchen, inwiefern ein Implantat, welches aus verschiedenen Oberflächen bestünde, die periimplantäre Taschenbildung verhindern würde. Auf Höhe der Epidermis müsste das Implantat die Oberfläche besitzen, welche das Epithelwachstum am besten fördert, auf Höhe der Dermis dagegen die Oberfläche, welche das Fibroblastenwachstum am besten fördert. Vermutlich ließe sich so ein Herabwachsen von Epithelzellen verhindern. Mit Hilfe meiner Experimente versuchte ich ebenfalls herauszufinden, auf welcher Oberfläche die Zellen am besten proliferieren bzw. ob gar eine Oberfläche, die so noch nicht in der Literatur untersucht wurde, das Proliferationsverhalten der Zellen positiv beeinflusst. In Anlehnung an meine Ergebnisse würde das für den Werkstoff Titan bedeuten, dass die Oberfläche auf Höhe der Mukosa gestrahlt und auf der Höhe des submukösen Bindegewebes poliert sein müsste. Denn diese Oberflächen wiesen am zweiten Messtag die höchst Zellzahl auf. Für Zirkoniumdioxid würde dies auf der anderen Seite bedeuten, dass die Oberfläche auf Höhe der Mukosa maschinert und auf Höhe des submukösen Bindegewebes gestrahlt sein müsste.

Da Entzündungen entlang des Implantats häufig für einen Implantatverlust verantwortlich sind, wäre es auch von großem Interesse, ob durch vermehrtes Wachstum auf der Implantatoberfläche oder verbesserte Zellhaftung auf dem Implantat die Gefahr einer periimplantären Entzündung vermindert werden kann. Es wäre natürlich denkbar, dass der Gesamteffekt von Proliferation und Adhäsion entscheidend ist.

Zu einer erfolgreichen Osseointegration und einem Langzeiterfolg eines Implantats kommt es nur, wenn der Heilungsprozess ungestört ablaufen kann. Jedoch kommt es durch mikrobielle Besiedlung und Bildung eines Biofilms zu einer Beeinflussung des Heilungsprozesses (Lima *et al.*, 2008; Scarano *et al.*, 2004; Rimondini *et al.*, 2002; Quirynen *et al.*, 2002). Von daher geht von jeder mikrobiellen Besiedlung auf einem Implantat eine Gefährdung für den Erfolg eines Implantates aus (Persson *et al.*, 1996; Quirynen *et al.*, 2002). Der Erfolg eines Implantates hängt folglich von vielen Faktoren, wie der Materialeigenschaft, Gestaltung der Aufbauten und der Bearbeitungsmethode, ab. Diese Faktoren können nämlich die mikrobielle Anlagerung fördern. Roos-Jansaker *et al.* (2006) stellten fest, dass sich nach 9-14 Jahren bei 16% der Implantate Infektionen im periimplantären Gewebe finden sowie eine beginnende Periimplantitis. Daneben kann eine bakterielle Adhäsion aber auch zu Gingividen führen und die Entstehung von Sekundärkaries an Nachbarzähnen fördern (Montanaro *et al.*, 2004). Die Arbeitsgruppe um Subramani *et al.* verglich von 1966 bis 2007 insgesamt 53 verschiedene Studien, die sich alle mit der Biofilmbildung auf Zahnimplantaten befassten. Dabei wollte man herausfinden, wie sich die Parameter Materialeigenschaft, chemische Zusammensetzung, Abutmentdesign, freie Oberflächenenergie und die Oberflächenrauigkeit auf die mikrobielle Adhäsion und die Biofilmbildung auswirkt. Dabei ergab sich, dass eine höhere Oberflächenenergie und eine hohe Oberflächenrauigkeit die bakterielle Anheftung fördern.

Scarano *et al.* (2004) ließen in ihrer Studie Patienten 24 Stunden lang ein spezielles Gerät, welches mit einer Titan- und einer Zirkoniumprobe ähnlicher Oberflächenrauigkeit ausgestattet war, in der Molarenregion tragen. Nach Ablauf der 24 Stunden ließen sich mehr adhärierte Mikroorganismen auf der Titan- als auf der Zirkoniumoberfläche nachweisen.

Folglich entscheidet nicht nur die Adhäsion von Fibroblasten und Epithelzellen über Erfolg oder Misserfolg eines Implantates, sondern auch viele andere Faktoren,

welche alle bei der weiteren Entwicklung von Implantaten berücksichtigt werden sollten. So sollte ein Implantat auf der einen Seite so gestaltet sein, dass eine gute Osseointegration gewährleistet ist, gleichzeitig sollte jedoch die Plaquebildung am Implantathals möglichst gering sein, zur Vorbeugung einer Periimplantitis. Zudem ist aber nicht nur die Oberflächenrauigkeit, sondern auch das Material an sich für die Biofilmbildung entscheidend.

Literaturverzeichnis

Abke J. *Verbesserung der Biokompatibilität metallischer Implantate durch kovalente Anbindung einer quervernetzten Kollagenschicht*. Dissertationsschrift. Regensburg., 2003.

Abrahamsson I., Berglundh T., Wennstrom J., Lindhe J. *The peri-implant hard and soft tissues at different implant systems. A comparative study in the dog*. Clin Oral Implants Res; 7: 212-219, 1996.

Adell R., Eriksson B., Lekholm U., Brånemark P.I., Jemt T. *Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws*. Int J Maxillofac Implants 5: 347-359., 1990.

Akagawa Y., Takata T., Matsumoto T., Nikai H., Tsuru H. *Correlation between clinical and histological evaluations of the peri-implant gingiva around the single-crystal sapphire endosseous implant*. J Oral Rehabil; 16: 581-587, 1989.

Albrektsson T., Zarb G., Worthington P., Eriksson A.R. *The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success*. Int J Maxillofac Implants 1: 11-25., 1988.

Aldini N.N., Fini M., Giavaresi G., Martini L., Dubini B., Ponzi Bossi M.G., Rustichelli F., Krajewski A., Ravaglioli A., Mazzocchi M., Giardino R. *Osteointegration of bioactive glass-coated and uncoated zirconia in osteopenic bone: an in vivo experimental study*. J Biomed Mater Res A 68: 264-272., 2004.

Aldini N.N., Fini M., Giavaresi G., Torricelli P., Martini L., Giardino R., Ravaglioli A., Krajewski A., Mazzocchi M., Dubini B., Ponzi-Bossi M.G., Rustichelli F., Stanic V. *Improvement in zirconia osseointegration by means of a biological glass coating: An in vitro and in vivo investigation*. J Biomed Mater Res 61: 282-289., 2002.

Arvidson K., Fartash B., Hilliges M., Kondell P.A. *Histological characteristics of peri-implant mucosa around Brånemark and single-crystal sapphire implants*. Clin Oral Implants Res; 7: 1-10, 1996.

Baharloo B., Textor M., Brunette D. M. *Substratum roughness alters the growth, area, and focal adhesions of epithelial cells, and their proximity to titanium surfaces*. Wiley InterScience. DOI: 10.1002/jbm.a.30321, 2005.

Baslé M. F., Lesourd M., Grizon, F., Pascaretti C., Chappard D. *Typ-I-Kollagen im xenogenen Knochenmaterial reguliert Anbindung und Verbreitung von Osteoblasten über die $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit*. Orthopäde 27, Seite 136-142. URL: LHEA, Laboratoire d'Histologie-Embryologie, Faculté de Médecine, rue Haute de Reculée, F-49045 Angers-Cédex, 1998.

- Berglundh T., Lindhe J., Ericsson I., Marinello C.P., Liljenberg B., Thomsen P. *The soft tissue barrier at implants and teeth*. Clin Oral Implants Res; 2: 81-90, 1991.
- Berglundh T., Lindhe J., Jonsson K. , Ericsson I. *The topography of the vascular systems in the periodontal and peri-implant tissues in the dog*. J Clin Periodontol; 21: 189-193, 1994.
- Berglundh T., Lindhe J., Marinello C., Ericsson I., Liljenberg B. *Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog*. Clin Oral Implants Res; 3: 1-8, 1992.
- Bershadsky A., Chausovsky A., Becker E., Lyubimova A., Geiger B. *Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction*. Curr Biol 6, 1279-1289, 1996.
- Bianco P.D., Ducheyne P., Cuckler J.M. *Local accumulation of titanium released from a titanium implant in the absence of wear*. J Biomed Mater Res 31: 227-234., 1996.
- Blaschke C., Volz U. *Soft and hard tissue response to zirconium dioxide dental implants -a clinical study in man*. Neuro Endocrinol Lett 27 Suppl 1: 69-72, 2006.
- Borghetti P., De Angelis E., Caldara G., Corradi A., Cacchioli A., Gabbi C. *Adaptive response of osteoblasts grown on a titanium surface: morphology, cell proliferation and stress protein synthesis*. Vet Res Commun. 2005 Aug;29 Suppl 2:221-4., 2005.
- Bradford M.M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. Bd. 72, S. 248-254., 1976.
- Brånemark P.I. *Osseointegration and its experimental background*. J Prosthet Dent 50: 399-410., 1983.
- Brånemark P.I., Adell R., Breine U., Hansson B.O., Lindstrom J., Ohlsson A. *Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies*. Scand J Plast Reconstr Surg 3: 81-100., 1969.
- Brånemark P.I., Breine U. *Formation of bone marrow in isolated segment*. Ann Hematol 10: 236-252., 1964.
- Brånemark P.I., Zarb G.A. , Albrektsson T.H. *Tissue-Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. Quintessenz, Chicago, 1985.
- Burke F.J., Ali A., Palin W.M. *Zirconia-based all-ceramic crowns and bridges: three case reports*. Dent Update 33: 401-402, 405-406, 409-410., 2006.
- Burnette W. N. *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radioionated protein A*. Anal Biochem 112 , 195 -203, 1981.

- Burridge K., Chrzanowska-Wodnicka M., Zhong C. *Focal adhesion assembly*. Trends Cell Biol 7, 342-347, 1997.
- Burridge K., Fath K., Kelly T., Nuckolls G., Turner C. *Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton*. Annu Rev Cell Biol 4, 487-525, 1988.
- Buser D., Mericske-Stern R., Bernard J.P., Behneke A., Behneke N., Hirt H.P., Belser U.C., Lang N.P. *Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants*. Clin Oral Impl Res 8: 161-172., 1997.
- Buser D., Weber H.P., Donath K., Fiorellini J.P., Paquette D.W. , Williams R.C. *Soft tissue reactions to non-submerged unloaded titanium implants in beagle dogs*. J Periodontol; 63: 225-235, 1992.
- Canullo L. *Clinical outcome study of customized zirconia abutments for single-implant restorations*. Int J Prosthodont 20: 489-493., 2007.
- Chehrودي B., Soorany E., Black N., Weston L. , Brunette D.M. *Computer-assisted three-dimensional reconstruction of epithelial cells attached to percutaneous implants*. J Biomed Mater Res; 29: 371-379, 1995.
- Christel P., Meunier A., Heller M., Torre J.P., Peille C.N. *Mechanical properties and short-term in-vivo evaluation of yttrium-oxide-partially-stabilized zirconia*. J Biomed Mater Res 23: 45-61., 1989.
- Chrzanowska-Wodnicka M., Burridge K. *Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions*. J Cell Biol 133, 1403-1415, 1996.
- Cochran D.L., Simpson J., Weber H.P., Buser D. *Attachment and growth of periodontal cells on smooth and rough titanium*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1994.
- Covacci V., Bruzzese N., Maccauro G., Andreassi C., Ricci G.A., Piconi C., Marmo E., Burger W., Cittadini A. *In vitro evaluation of the mutagenic and carcinogenic power of high purity zirconia ceramic*. Biomaterials 20: 371-376., 1999.
- Critchley D.R. *Focal adhesions – the cytoskeletal connection*. Curr Opin Cell Biol 12, 133-139, 2000.
- Curtis A.S., McGrath M., Gasmi L. *Localised application of an activating signal to a cell: experimental use of fibronectin bound to beads and the implications for mechanisms of adhesion*. J Cell Sci 101 [Pt 2], Seite 427-36, 1992.
- Davies J.E. *Mechanisms of endosseous integration*. Int J Prosthodont 11: 391-401., 1998.
- . *Understanding peri-implant endosseous healing*. J Dent Educ 67: 932-949., 2003.

Depprich R., Zipprich H., Ommerborn M., Naujoks C., Wiesmann H.P., Kiattavorncharoen S., Lauer H.C., Meyer U., Kübler N.R., Handschel J. *Osseointegration of zirconia implants compared with titanium: an in vivo study*. Head Face Med 4: 30-37., 2008.

Ericsson I., Berglundh T., Marinello C., Liljenberg B., Lindhe J. *Long-standing plaque and gingivitis at implants and teeth in the dog*. Clin Oral Implants Res; 3: 99-103, 1992.

Ericsson I., Randow K., Nilner K., Petersson A. *Some clinical and radiographical features of submerged and non-submerged titanium implants. A 5-year follow-up study*. Clin Oral Implants Res; 8: 422-426, 1997.

Evans E.J. *Cell damage in vitro following direct contact with fine particles of titanium, titanium alloy and cobalt-chrome-molybdenum alloy*. Biomaterials 15: 713-717., 1994.

Feneis H. *Gefüge und Funktion des normalen Zahnfleisches*. Dtsch zahnärztl. Z; 7: 467-468, 1952.

Formigini M. S. *Protesi dentaria a Metzzoo di infibulazione diretta*. Riv. ital. Stomatol. 2: 193, 1947.

Geiger B., Bershadsky A.,. *Assembly and mechanosensory function of focal contacts*. Curr Opin Cell Biol 13, 584-592, 2001.

Gilmore A.P., Burrridge K. *Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate*. Nature 381, 531-535, 1996.

Gould T.R., Westbury L., Brunette D.M. *Ultrastructural study of the attachment of human gingiva to titanium in vivo*. J Prosthet Dent; 52: 418-420, 1984.

Henry P.J., Laney W.R., Jemt T., Harris D., Krogh P.H., Polizzi G., Zarb G.A., Herrmann I. *Osseointegrated implants for single-tooth replacement: a prospective 5-year multicenter study*. Int J Maxillofac Implants 11: 450-455., 1996.

Heydecke G., Kohal R.J., Gläser R. *Optimal esthetics in single-tooth replacement with the Re-Implant system: a case report*. Int J Prosthodont 12: 184-189., 1999.

Hinz B., Gabbiani G. *Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts*. Curr Opin Biotechnol. 2003 Oct;14(5):538-46., 2003.

Hormia M., Könönen M. *Immunolocalization of fibronectin and vitronectin receptors in human gingival fibroblasts spreading on titanium surfaces*. J Periodontal Res. 1994 Mar;29(2):146-52., 1994.

Hormia M., Könönen M., Kivilahti J., Virtanen I. *Immunolocalization of proteins specific for adherens junctions in human gingival epithelial cells grown on differently processed titanium surfaces*. J Periodontal Res, 1991.

Hynes R.O. *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell 69, 11-25, 1992.

Ichikawa Y., Akagawa Y., Nikai H., Tsuru H. *Tissue compatibility and stability of a new zirconia ceramic in vivo*. J Prosthet Dent 68: 322-326., 1992.

Ivaska J., Heino J. *Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix*. Cell Mol Life Sci 57, 16-24, 2000.

Jahn M., d'Hoedt B. *Zur Definition des Erfolges bei dentalen Implantaten. Ein Vergleich verschiedener Kriterien*. Z Zahnärztl Implantol 8: 221-226., 1992.

James R.A., Schultz R.L. *Hemidesmosomes and the adhesion of junctional epithelial cells to metal implants--a preliminary report*. Oral Implantol; 4: 294-302, 1974.

Jansen J.A., de Wijn J.R., Wolters-Lutgerhorst J.M., van Mullem P.J. *Ultrastructural study of epithelial cell attachment to implant materials*. J Dent Res. 1985 Jun;64(6):891-6., 1985.

Jemt T. *Fixed implant-supported prostheses in the edentulous maxilla. A five-year follow-up report*. Clin Oral Impl Res 5: 142-147., 1994.

Kaplan E.L., Meier P. *Nonparametric estimation from incomplete observations*. J Am Statist Assoc 1958;53:457-481, 1958.

Kasemo B, Lausmaa J. *Biomaterials and interfaces*. In: *Osseointegration in oral rehabilitation*. Eds.: Naert I, van Steenberghe D and Worthington P. Quintessence, London., 1993.

Kasemo B., Lausmaa J. *Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach*. Int J Maxillofac Implants 3: 247-259., 1988.

Kasten F.H., Soileau K., Meffert R.M. *Quantitative evaluation of human gingival epithelial cell attachment to implant surfaces in vitro*. Int J Periodontics Restorative Dent. 1990;10(1):68-79., 1990.

Kawahara H., Kawahara D., Hashimoto K., Takashima Y., Ong J.L. *Morphologic studies on the biologic seal of titanium dental implants. Report I. In vitro study on the epithelialization mechanism around the dental implant*. Int J Oral Maxillofac Implants; 13: 457-464, 1998.

Kim D.J., Lee M.H., Lee D.Y., Han J.S. *Mechanical properties, phase stability, and biocompatibility of (Y, Nb)-TZP/Al(2)O(3) composite abutments for dental implant*. J Biomed Mater Res 53: 438-443., 2000.

Kohal R.J., Weng D., Bächle M., Klaus G. *Zirkonoxid-Implantate unter Belastung - Eine vergleichende histologische, tierexperimentelle Untersuchung*. Z Zahnärztl Implantol 19: 88-91., 2003.

- Könönen M., Hormia M., Kivilahti J., Hautaniemi J., Thesleff I. *Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium.* J Biomed Mater Res. 1992 Oct;26(10):1325-41., 1992.
- Lalor P.A., Revell P.A., Gray A.B., Wright S., Railton G.T., Freeman M.A. *Sensitivity to titanium. A cause of implant failure?* J Bone Joint Surg Br 73: 25-28, 1991.
- Lang N.P., Bragger U., Walther D., Beamer B., Kornman K.S. *Ligature-induced peri-implant infection in cynomolgus monkeys. I. Clinical and radiographic findings.* Clin Oral Implants Res; 4: 2-11, 1993.
- Lekholm U., Ericsson I., Adell R. , Slots J. *The condition of the soft tissues at tooth and fixture abutments supporting fixed bridges. A microbiological and histological study.* J Clin Periodontol; 13: 558-562, 1986b.
- Liljenberg B., Gualini F., Berglundh T., Tonetti M., Lindhe J. *Composition of plaque-associated lesions in the gingiva and the peri-implant mucosa in partially edentulous subjects.* J Clin Periodontol; 24: 119-123, 1997.
- Lima E.M., Koo H., Smith A.M., Rosalen P.L., Del Bel Cury A.A. *Adsorption of salivary and serum proteins, and bacterial adherence on titanium and zirconia ceramic surfaces.* Clin Oral Impl Res 19: 780-785, 2008.
- Lindhe J., Berglundh T. *The interface between the mucosa and the implant.* Periodontol 2000; 17: 47-54, 1998.
- Linkow L.J. *Clinical Evaluation of the various designed endosseous.* J. oral Implantol.12: 35, 1966.
- Listgarten M.A. *Soft and hard tissue response to endosseous dental implants.* Anat Rec; 245: 410-425, 1996.
- Listgarten, M.A. , Lai, C.H. *Ultrastructure of the intact interface between an endosseous epoxy resin dental implant and the host tissues.* J Biol Buccale; 3: 13-28, 1975.
- Listgarten, M.A., Lang, N.P., Schroeder, H.E. , Schroeder, A. *Periodontal tissues and their counterparts around endosseous implants [corrected and republished with original paging, article originally printed in Clin Oral Implants Res 1991 Jan-Mar;2(1):1-19].* Clin Oral Implants Res; 2: 1-19, 1991.
- Lotz M.M., Burdsal C.A., Erickson H.P., McClay D.R. *Cell adhesion to fibronectin and tenascin: quantitative measurements of initial binding and subsequent strengthening response.* J Cell Biol. 1989 Oct;109(4 Pt 1):1795-805., 1989.
- Mackenzie I.C., Hill M.W. *Connective tissue influences on patterns of epithelial architecture and keratinization in skin and oral mucosa of the adult mouse.* Cell Tissue Res; 235: 551-559, 1984.

- Mackenzie, I.C. , Tonetti, M.S. *Formation of normal gingival epithelial phenotypes around osseointegrated oral implants in humans*. J Periodontol; 66: 933-943, 1995.
- Mainjot A., Legros C., Vanheusden A. *Les piliers en ceramique*. Rev Belge Med Dent 61: 96-108., 2006.
- Mckinney R.V. Jr., Steflik D.E. , Koth D.L. *Evidence for a junctional epithelial attachment to ceramic dental implants. A transmission electron microscopic study*. J Periodontol; 56: 579-591, 1985.
- Mckinney, R.V., Jr., Steflik, D.E. , Koth, D.L. *The epithelium dental implant interface*. J Oral Implantol; 13: 622-641, 1988.
- Mellinghoff J. *Erste klinische Ergebnisse zu dentalen Schraubenimplantaten aus Zirkonoxid*. Z Zahnärztl Implantol 22: 288-293., 2006.
- Meyenberg K.H., Lüthy H., Schärer P. *Zirconia posts: a new all-ceramic concept for nonvital abutment teeth*. J Esthet Dent 7: 73-80., 1995.
- Mikhalski D., Wissing K.M., Ghisdal L., Broeders N., Touly M., Hoang A.D., Loi P., Mboti F., Donckier V. *Cold ischemia is a major determinant of acute*. Transplantation 85: 3-9, 2008.
- Moberg L.E., Kondell P.A., Kullman L., Heimdahl A., Gynther G.W. *Evaluation of single-tooth restorations on ITI dental implants. A prospective study of 29 patients*. Clin Oral Impl Res 10: 45-53.
- Montanaro L., Campoccia D., Rizzi S., Donati M.E., Breschi L., Prati C., Arciola C.R. *Evaluation of bacterial adhesion of Streptococcus mutans on dental restorative materials*. Biomaterials 25: 4457-4463, 2004.
- Moon I.S., Berglundh T., Abrahamsson I., Linder E. , Lindhe J. *The barrier between the keratinized mucosa and the dental implant. An experimental study in the dog*. J Clin Periodontol; 26: 658-663, 1999.
- Müller R. *Bericht der 74. Tagung der Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde*. Düsseldorf 45, 1937.
- Nothdurft F.P., Doppler K.E., Erdelt K.J., Knauber A.W., Pospiech P.R. *Fracture behavior of straight or angulated zirconia implant abutments supporting anterior single crowns*. Clin Oral Investig. 2011 Apr;15(2):157-63. Epub 2010 Jan 19., 2011.
- Nothdurft F.P., Pospiech P.R. *Zirconium dioxide implant abutments for posterior single-tooth replacement: first results*. J Periodontol. 2009 Dec; 80(12):2065-72., 2009.
- O'Keefe E.J., Payne R.E. Jr., Russell N., Woodley D.T. *Spreading and Enhanced Motility of Human Keratinocytes on Fibronectin*. The Journal of Investigative Dermatology 85 [2], Seite 125-130, 1985.

- Oliva J., Oliva X., Oliva J.D. *One-year follow-up of first consecutive 100 zirconia dental implants in humans: a comparison of 2 different rough surfaces.* Int J Maxillofac Implants 22: 430-435., 2007.
- Pae A., Lee H., Kim H.S., Kwon Y.D., Woo Y.H. *Attachment and growth behaviour of human gingival fibroblasts on titanium and zirconia ceramic surfaces.* Biomed Mater. 2009 Apr;4(2):025005. Epub 2009 Feb 11., 2009.
- Page R.C., Ammons W.F., Schectman L.R. , Dillingham L.A. *Collagen fibre bundles of the normal marginal gingiva in the marmoset.* Arch Oral Biol; 19: 1039-1043, 1974.
- Palacci P., Ericsson I., Engstrad P. , Rangert B. *Optimal Implant Positioning & Soft Tissue Management for the Brånemark System(R).* Quintessence, Chicago, 1995.
- Parsons J.T., Martin K.H., Slack J.K., Taylor J.M., Weed S.A. *Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement.* Oncogene 19, 5606-5613, 2000.
- Persson L.G., Lekholm U., Leonhardt A., Dahlén G., Lindhe J. *Bacterial colonization on internal surfaces of Brånemark system implant components.* Clin Oral Impl Res 7: 90-95, 1996.
- Prestipino V., Ingber A. *All-ceramic implant abutments: esthetic indications.* J Esthet Dent 8: 255-262., 1996.
- Pruin E.H. *Long experience with implants.* Quintessenz. 25 (1974) 13-22 contd., 1974.
- Quiroga I., McShane P., Koo D.D., Gray D., Friend P.J., Fuggle S., Darby C. *Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival."* Nephrol Dial Transplant. 21: 1689-96, 2006.
- Quirynen M., De Soete M., van Steenberghe D. *Infection risks for oral implants: A review of the literature.* Clin Oral Implants Res 13: 1-19, 2002.
- . *Infectious risks for oral implants: A review of the literature.* Clin Oral Impl Res 4: 158-161, 2002.
- Räisänen L., Könönen M., Juhanoja J., Varpavaara P., Hautaniemi J., Kivilahti J., Hormia M. *Expression of cell adhesion complexes in epithelial cells seeded on biomaterial surfaces.* J Biomed Mater Res. 2000 Jan;49(1):79-87, 2000.
- Reclaru L., Meyer J.M. *Study of corrosion between a titanium implant and dental alloys.* J Dent 22: 159-168., 1994.
- Reichenbach E., Naucke R. *The implantation of metallic braces for dental prosthetic Purposes.* Zentralbl Chir 80 (1955) 769-78, 1955.
- Richards R.G., Stiffanic M., Owen G.R.H., Riehle M., Gwynn I.A.P., Curtis A.S.G. *Immunogold labelling of fibroblast focal adhesion sites visualised in fixed material*

using scanning electron microscopy, and living, using internal reflection microscopy. Cell Biology International, 25 . pp. 1237-1249., 2001.

Rimondini L., Cerroni L., Carrassi A., Torricelli P. *Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study.* Int J Oral Maxillofac Impl 17: 793-798, 2002.

Roos-Jansaker A.M., Lindahl C., Renvert H., Renvert S. *Nine-to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part II: presence of peri-implant lesions.* J Clin Periodontol 33: 290-295, 2006.

Ruggeri A., Franchi M., Marini N., Trisi P., Piatelli A. *Supracrestal circular collagen fiber network around osseointegrated nonsubmerged titanium implants.* Clin Oral Implants Res; 3: 169-175, 1992.

Sader M.S., Balduino A., Soares Gde A., Borojevic R. *Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation.* Clin Oral Implants Res. 2005 Dec;16(6):667-75., 2005.

Sastry S.K., Burrridge K. *Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics.* Exp Cell Res 261, 25-36, 2000.

Scarano A., Piattelli M., Caputi S., Favero G.A., Piattelli A. *Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study.* J Periodontol 75: 292-296, 2004.

Schlegel K.A., Schultze-Mosgau S., Wiltfang J. *Implantologie in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie.* HNO 50: 699-718, 2002.

Schmidt M. *Spezifische Absorption organischer Moleküle auf oxidiertem Titan: "Bioaktivität auf molekularem Niveau".* Hans Huber, Bern., 1992.

Schroeder A., Van Der Zypen E., Stich H., Sutter F. *The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces.* J Maxillofac Surg; 9: 15-25, 1981.

Schulte W., d'Hoedt B., Axmann D., et al. *15 Jahre Tübinger Implantat und seine Weiterentwicklung zum Frialit-2®-System.* Z Zahnärztl Implantol 1992;8:77-96, 1992.

Schulte W., Heimke G. *Das Tübinger Sofort-Implantat.* Quintessenz 1976;6:17-23, 1976.

Schulte W., Heimke G., d'Hoedt B. *Enossale Implantate (Frialit Typ Tübingen) aus Aluminiumoxidkeramik. In: Franke J (Hrsg). Der heutige Stand der Implantologie – Ein Symposium.* München: Hanser, 1980:121-130, 1980.

Schwenzer N., Ehrenfeld M. *Zahnärztliche Chirurgie Lehrbuch zur Aus- und Weiterbildung: Zahn-, Mund-, Kieferheilkunde: Band 3.* Thieme: 127-168, 2000.

- Seymour G.J., Gemmell E., Lenz L.J., Henry P., Bower R., Yamazaki K. *Immunohistologic analysis of the inflammatory infiltrates associated with osseointegrated implants*. Int J Oral Maxillofac Implants; 4: 191-198, 1989.
- Sheppard C. J. R. *Confocal microscopy: basic principals and system performance*. miscellaneous, 1993.
- Sicilia A., Cuesta S., Coma G., Arregui I., Guisasola C., Ruiz E., Maestro A. *Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients*. Clin Oral Implants Res 19: 823-835., 2008.
- Squier C.A., Collins P. *The relationship between soft tissue attachment, epithelial downgrowth and surface porosity*. J Periodontal Res; 16: 434-440, 1981.
- Steflik D.E., McKinney R.V., Sisk A.L., Koth D.L., Singh B.B., Parr G.R. *Ultrastructural investigations of the bone and fibrous connective tissue interface with endosteal dental implants*. Scanning Microsc; 4: 1039-1047; discussion on 1047-1038, 1990.
- Steinemann S.G. *Werkstoff Titan*. In: *Orale Implantologie*. Eds.: Schroeder A, Sutter F and Krekeler G. Thieme, Stuttgart. pp. 37-59., 1988.
- Strock A.E. *Experimental work on a method for the replacement of*. J. Orthodont. 25: 467, 1939.
- Strub J.R., Türp J.C., Witkowski S., Hürzeler M.B., Kern M. *Einführung in die dentale Implantologie*. Strub, J.R., Türp, J.C., Witkowski, S., Hürzeler, M.B., Kern, M. *Curriculum Prothetik. Bänder I-III*. 1. Aufl. Quintessenz, Berlin, ISBN 3-87652-522-X; Band III: S. 1069-1163, 1994.
- Subramani K., Jung R.E., Molenberg A., Hämmerle C.H.F. *Biofilm on dental implants: a review of the literature*. Int J Oral Maxillofac Implants 24: 616-626, 2009.
- Takamori E.R., Cruz R., Gonçalves F., Zanetti R.V., Zanetti A., Granjeiro J.M. *Effect of roughness of zirconia and titanium on fibroblast adhesion*. Artif Organs. 2008 Apr;32(4):305-9., 2008.
- Tetsch P. *Enossale Implantationen in der Zahnheilkunde – Ein Atlas und Lehrbuch*. München: Hanser, 1991:92-104,111-158, 1991.
- Toumelin-Chemla F., Rouelle F., Burdairon G. *Corrosive properties of fluoride-containing odontologic gels against titanium*. J Dent 24: 109-115., 1996.
- Tschernitschek H., Borchers L., Geurtsen W. *Nonalloyed titanium as a bioinert metal -a review*. Quintessence Int 36: 523-530., 2005.
- van der Flier A., Sonnenberg A. *Function and interactions of integrins*. Cell Tissue Res 305, 285-298, 2001.

van Steenberghe D. *A retrospective multicenter evaluation of the survival rate of osseointegrated fixtures supporting fixed partial prostheses in the treatment of partial edentulism.* J Prosthet Dent 61: 217-223., 1989.

Volz U. *Metallfreie Rekonstruktion? Eine Fallbeschreibung.* Z Zahnärztl Implantol 19: 176-180., 2003.

Wagner W., Al Nawas B. *Implantatmaterialien und Konstruktionsprinzipien der Implantate aus chirurgischer Sicht.* In: Koeck B, Wagner W. *Praxis der Zahnheilkunde Implantologie.* München: Urban&Fischer, 2004:77-92, 2004.

Wagner W., Al-Nawas B. *Implantatmaterialien und Konstruktionsprinzipien der Implantate aus chirurgischer Sicht.* In: *Implantologie.* Eds.: Koeck B and Wagner W. Urban & Fischer, München. pp. 61-97., 2004.

Watzek G., Mailath-Pokorny G. *Zahnärztliche Implantate.* In: Schwenzer N, Ehrenfeld M (Hrsg). *Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde Band 3: Zahnärztliche Chirurgie.* Stuttgart: Thieme, 2000: 127-168, 2000.

Weingart D., Steinemann S., Schilli W., Strub J.R., Hellerich U., Assenmacher J., Simpson J. *Titanium deposition in regional lymph nodes after insertion of titanium screw implants in maxillofacial region.* Int J Maxillofac Implants 23: 450-452, 1994.

Wohlwend A., Studer S., Schärer P. *Das Zirkonoxid-Abutment -ein neues vollkeramisches Konzept zur ästhetischen Verbesserung der Suprastruktur in der Implantologie.* Quintessenz Zahntech 22: 364-381., 1996.

Zwicker U. *Martensite in titanium alloys.* Z Metallkd 50: 261-268., 1959.

Anhang

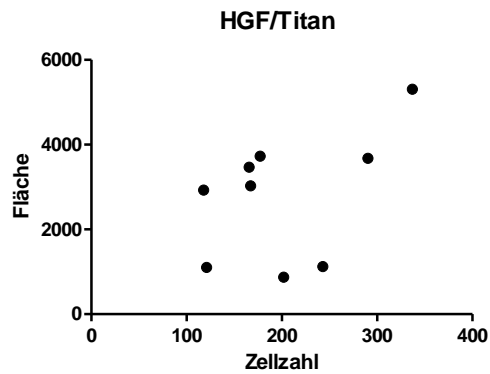


Abbildung 46: Flächen- und Zellzahlkorrelation der Fibroblasten auf Titan

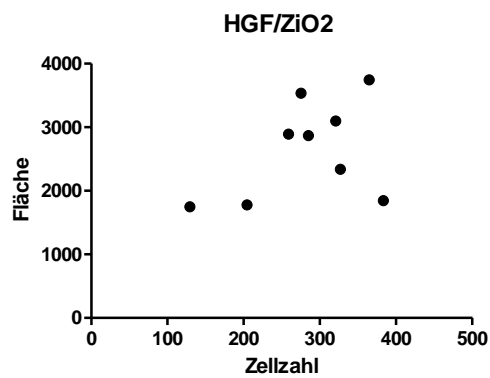


Abbildung 47: Flächen- und Zellzahlkorrelation der Fibroblasten auf Zirkoniumdioxid

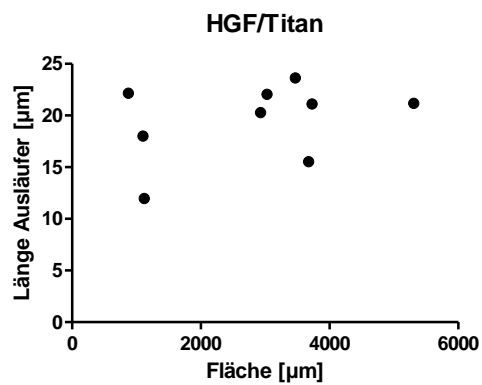


Abbildung 48: Ausläuferlängen- und Flächenkorrelation der Fibroblasten auf Titan

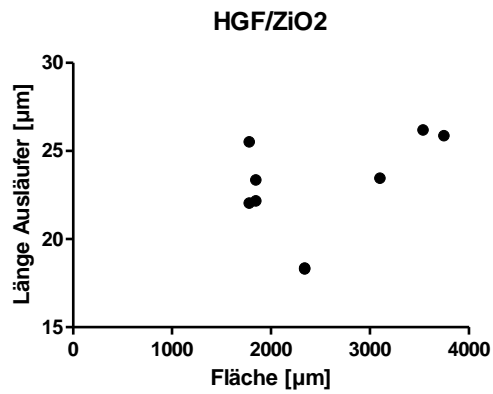


Abbildung 49: Ausläuferlängen- und Flächenkorrelation der Fibroblasten auf Zirkoniumdioxid

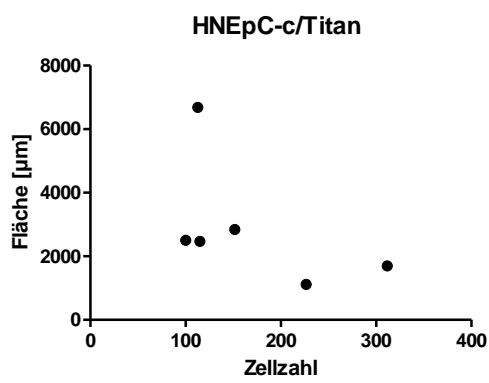


Abbildung 50: Flächen- und Zellzahlkorrelation der Epithelzellen auf Titan

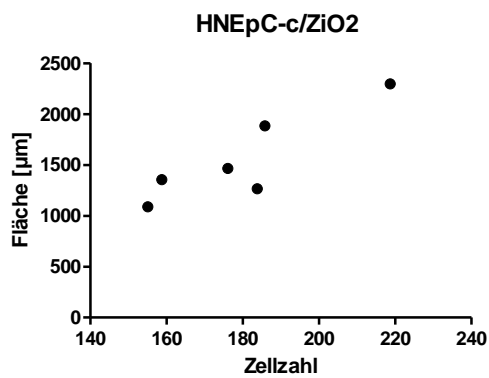


Abbildung 51: Flächen- und Zellzahlkorrelation der Epithelzellen auf Zirkoniumdioxid

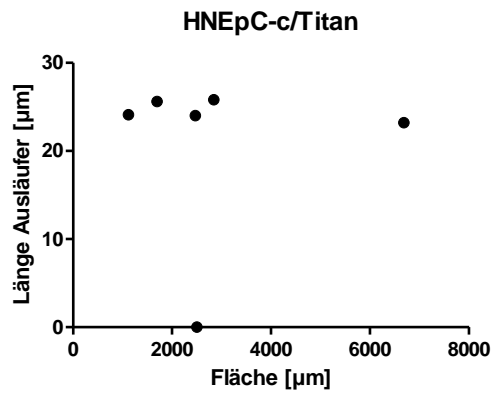


Abbildung 52: Ausläuferlängen- und Flächenkorrelation der Epithelzellen auf Titan

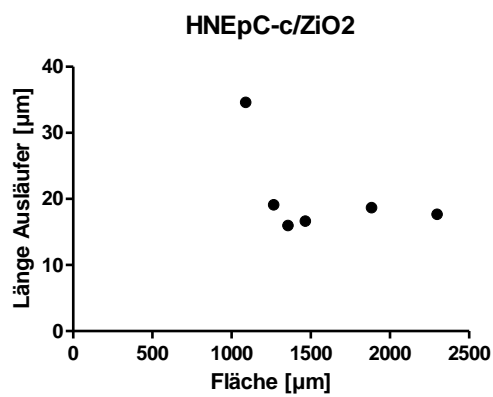


Abbildung 53: Ausläuferlängen- und Flächenkorrelation der Epithelzellen auf Zirkoniumdioxid

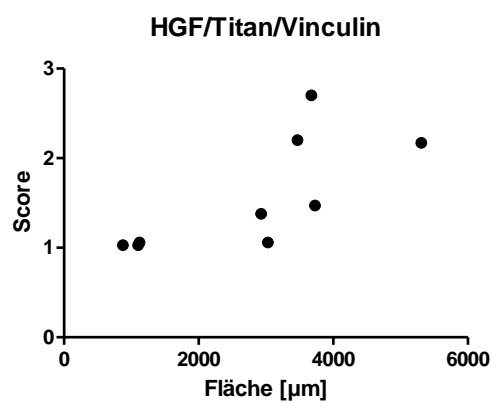


Abbildung 54: Vinculin-Score- und Flächenkorrelation der Fibroblasten auf Titan

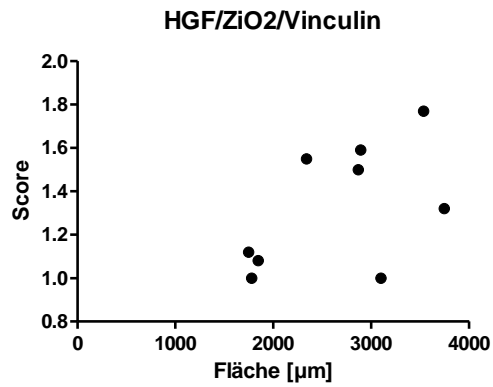


Abbildung 55: Vinculin-Score- und Flächenkorrelation der Fibroblasten auf Zirkoniumdioxid

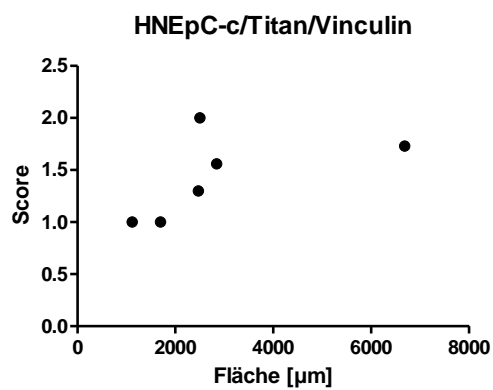


Abbildung 56: Vinculin-Score- und Flächenkorrelation der Epithelzellen auf Titan

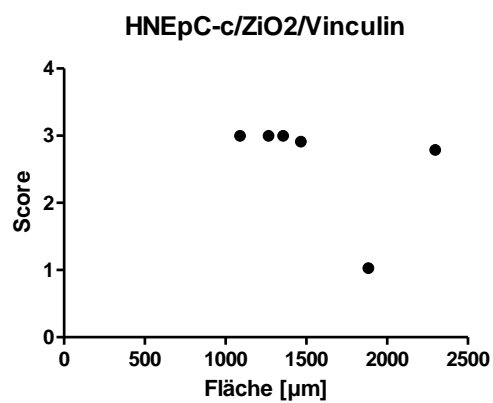


Abbildung 57: Vinculin-Score- und Flächenkorrelation der Epithelzellen auf Zirkoniumdioxid

Danksagung/geplante Publikation

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. rer. nat. Peter Lipp bedanken, der es mir ermöglicht hat, diese Dissertation unter seiner Betreuung anzufertigen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. dent. Frank P. Nothdurft danke ich ganz herzlich für die Idee für diese Dissertation, die vielseitigen und weiterleitenden Anregungen sowie der ständigen ausgezeichneten wissenschaftlichen und finanziellen Unterstützung für dieses Projekt.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Dr. rer. nat. Lars Kästner und Frau Dr. rer. nat. Sandra Ruppenthal für ihre hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die Hilfe und Ihre ständige Unterstützung bei allen Problemen und Fragen.

Bei allen Mitarbeitern des Labors der Molekularen Zellbiologie möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima im Labor und ihre permanente Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den Laborarbeiten bedanken.

Herrn Andreas Knauber danke ich für die Herstellung der verschiedenen Zylinder sowie für die Herstellung der Silikonkissen.

Meinen Eltern danke ich für die Ermöglichung des Zahnmedizinstudiums und für Ihre vielseitige Unterstützung während dieser Zeit.

Nothdurft F. P., Fontana D. "Proliferation and attachment behaviour of fibroblasts and epithelial cells cultured on titanium alloy and zirconia dependent from surface topography" (als Arbeitstitel in Vorbereitung zur Publikation in ClinOralImplRes).

